

DIN EN ISO 10272-1:2023-07 (D)

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Zählung von *Campylobacter* spp. - Teil 1: Nachweisverfahren (ISO 10272-1:2017 + Amd 1:2023); Deutsche Fassung EN ISO 10272-1:2017 + A1:2023

Inhalt	Seite
Europäisches Vorwort.....	11
A1 Europäisches Vorwort der Änderung 1.....	12
Vorwort.....	13
A1 Vorwort der Änderung 1.....	15
Einleitung.....	16
1 Anwendungsbereich.....	17
2 Normative Verweisungen.....	17
3 Begriffe.....	17
4 Kurzbeschreibung.....	18
4.1 Allgemeines.....	18
4.2 Anreicherung in selektivem flüssigen Medium.....	18
4.2.1 Nachweisverfahren A.....	18
4.2.2 Nachweisverfahren B.....	18
4.2.3 Nachweisverfahren C.....	19
4.3 Isolierung auf selektivem festen Medium.....	19
4.3.1 Nachweisverfahren A.....	19
4.3.2 Nachweisverfahren B.....	19
4.3.3 Nachweisverfahren C.....	19
4.3.4 Nachweisverfahren A, B und C.....	19
4.4 Bestätigung.....	19
5 Nährmedien und Reagenzien.....	19
6 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
7 Probenahme.....	20
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe.....	20
9 Durchführung.....	21
9.1 Allgemeines.....	21
9.2 Prüfmenge und Erstverdünnung.....	21
9.2.1 Allgemeines.....	21
9.2.2 Nachweisverfahren A.....	22
9.2.3 Nachweisverfahren B.....	22
9.2.4 Nachweisverfahren C.....	22
9.3 Anreicherung.....	22
9.3.1 Nachweisverfahren A.....	22
9.3.2 Nachweisverfahren B.....	22
9.4 Isolierung.....	22
9.4.1 Nachweisverfahren A.....	22
9.4.2 Nachweisverfahren B.....	22
9.4.3 Nachweisverfahren A, B und C.....	23
9.5 Bestätigung von <i>Campylobacter</i>	23
9.5.1 Allgemeines.....	23

9.5.2	Auswahl von Kolonien für die Bestätigung.....	23
9.5.3	Untersuchung der Morphologie und Beweglichkeit	24
9.5.4	Untersuchung des aeroben Wachstums bei 25 °C.....	24
9.5.5	Nachweis der Oxidase-Aktivität	24
9.5.6	Auswertung	24
9.6	Identifizierung von <i>Campylobacter</i> -Spezies (optional)	24
9.6.1	Allgemeines.....	24
9.6.2	Nachweis von Katalase-Aktivität.....	25
9.6.3	Nachweis der Hydrolyse von Hippurat	25
9.6.4	Nachweis der Hydrolyse von Indoxylacetat	25
9.6.5	Auswertung.....	26
10	Angabe der Ergebnisse	26
11	Leistungsmerkmale des Verfahrens	26
11.1	Ringversuch	26
11.2	Empfindlichkeit	26
11.3	Spezifität	26
11.4	LOD ₅₀	27
12	Untersuchungsbericht	27
Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens.....		28
Anhang B (normativ) Nährmedien und Reagenzien.....		29
B.1	Allgemeines.....	29
B.2	Bolton-Bouillon.....	29
B.2.1	Grundmedium	29
B.2.2	Steriles lysiertes Pferdeblut	30
B.2.3	Antibiotische Lösung.....	30
B.2.4	Vollständiges Medium	30
B.3	A₁ Preston-Bouillon	31
B.3.1	Grundmedium	31
B.3.2	Steriles lysiertes Pferdeblut	31
B.3.3	Antibiotische Lösung.....	31
B.3.4	Wachstumszusatz.....	32
B.3.5	Vollständiges Medium	32
B.4	Modifizierter Aktivkohle-Cefoperazon-Desoxycholat-Agar (mCCD-Agar)	32
B.4.1	Grundmedium	32
B.4.2	Antibiotische Lösung.....	33
B.4.3	Vollständiges Medium	33
B.5	Selektives Ausplattierungsmedium, bei dem andere selektive Prinzipien als bei mCCD-Agar genutzt werden.....	34
B.6	Columbia-Blut-Agar	34
B.6.1	Grundmedium	34
B.6.2	Steriles Schafs- oder Pferdeblut	34
B.6.3	Vollständiges Medium	34
B.7	Reagens für den Nachweis von Oxidase-Aktivität	35
B.7.1	Zusammensetzung.....	35
B.7.2	Herstellung.....	35
B.8	Reagens für den Nachweis von Katalase-Aktivität.....	35
B.8.1	Zusammensetzung.....	35
B.8.2	Herstellung.....	35
B.9	Reagenzien für den Nachweis der Hydrolyse von Hippurat.....	35
B.9.1	Natriumhippuratlösung	35
B.9.2	Ninhydrinlösung, Massenanteil von 3,5 %.....	36
B.10	Indoxylacetat-Plättchen	36
B.10.1	Zusammensetzung.....	36
B.10.2	Herstellung.....	36
B.11	Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien	36

Anhang C (informativ) Untersuchungen zur Verfahrensvalidierung und Leistungsmerkmale	39
Anhang D (informativ) Multiplex-Real-Time-PCR-Verfahren zur Bestätigung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp.....	43
D.1 Allgemeines.....	43
D.2 Kurzbeschreibung.....	43
D.3 Reagenzien	43
D.3.1 Reagenzien für die Nukleinsäure-Extraktion.....	43
D.3.2 Reagenzien für die Real-Time-PCR.....	43
D.4 Geräte.....	44
D.4.1 Für die Nukleinsäure-Extraktion verwendete Ausstattung	44
D.4.2 Für die Real-Time-PCR verwendete Ausstattung.....	44
D.5 Durchführung	45
D.5.1 Nukleinsäure-Extraktion	45
D.5.2 PCR-Ansatz.....	45
D.5.3 PCR-Kontrollen	46
D.5.4 Temperatur-Zeit-Programm.....	46
D.6 Auswertung der Ergebnisse	46
D.7 Leistungsmerkmale des Verfahrens	47
D.7.1 Allgemeines.....	47
D.7.2 Theoretische Bewertung des Verfahrens	47
D.7.3 Inklusivität und Exklusivität	47
Anhang E (informativ) PCR-Verfahren zur molekularen Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp.....	49
E.1 Allgemeines.....	49
E.2 Gelbasiertes Multiplex-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp.....	49
E.2.1 Allgemeines.....	49
E.2.2 Kurzbeschreibung.....	49
E.2.3 Reagenzien	49
E.2.4 Geräte.....	51
E.2.5 Durchführung	52
E.2.6 Auswertung der Ergebnisse	55
E.2.7 Leistungsmerkmale	56
E.3 Multiplex-Real-Time-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp.....	57
E.3.1 Allgemeines.....	57
E.3.2 Kurzbeschreibung.....	57
E.3.3 Reagenzien	57
E.3.4 Geräte.....	59
E.3.5 Durchführung	59
E.3.6 Auswertung der Ergebnisse	61
E.3.7 Leistungsmerkmale	61
Anhang F (informativ) Untersuchungen zur Verfahrensvalidierung und Leistungsmerkmale	63
F.1 Ringversuch zum Multiplex-Real-Time-PCR-Verfahren zur Bestätigung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. (siehe Anhang D)	63
F.2 Ringversuch zum gelbasierten Multiplex-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. (siehe Abschnitt E.2).....	63
F.3 Ringversuch zum Real-Time-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten <i>Campylobacter</i> spp. (siehe Abschnitt E.3)	65
Literaturhinweise	66

Bilder

Bild A.1 — Fließschema der Verfahren zum Nachweis von <i>Campylobacter</i> in der Lebensmittelkette	28
Tabellen	
Tabelle 1 — Eigenschaften von <i>Campylobacter</i>.....	24
Tabelle 2 — Eigenschaften von <i>Campylobacter</i>-Spezies.....	26
Tabelle B.1 — Leistungsprüfung von Nährmedien für <i>Campylobacter</i>	37
Tabelle C.1 — Ergebnisse der Datenauswertung von Proben aus Blinddarm-Material von Masthähnchen (Verfahren C, direkte Ausplattierung).....	40
Tabelle C.2 — Ergebnisse der Datenauswertung von Proben aus gefrorenem Spinat (Verfahren A, Bolton-Bouillon).....	40
Tabelle C.3 — Ergebnisse der Datenauswertung von Proben aus Hackfleisch (Schwein/Rind) (Verfahren A, Bolton-Bouillon).....	41
Tabelle C.4 — Ergebnisse der Datenauswertung von Proben aus Rohmilch (Verfahren B, Preston-Bouillon).....	41
Tabelle C.5 — Ergebnisse der Datenauswertung von Proben aus Hühnerhaut (Verfahren B, Preston-Bouillon).....	42
Tabelle D.1 — Sequenzen von Oligonukleotiden.....	44
Tabelle D.2 — Reagenzien.....	45
Tabelle D.3 — Temperatur-Zeit-Programm.....	46
Tabelle D.4 — Inklusivität und Exklusivität.....	47
Tabelle E.1 — Sequenzen von Oligonukleotiden	50
Tabelle E.2 — Reagenzien	53
Tabelle E.3 — Temperatur-Zeit-Programm	54
Tabelle E.4 — Größe von Amplifikationsprodukten	55
Tabelle E.5 — Inklusivität und Exklusivität.....	56
Tabelle E.6 — Sequenzen von Oligonukleotiden	58
Tabelle E.7 — Reagenzien	60
Tabelle E.8 — Temperatur-Zeit-Programm	61
Tabelle E.9 — Inklusivität und Exklusivität.....	62
Tabelle F.1 — Daten aus dem Ringversuch	63
Tabelle F.2 — Inklusivität und Exklusivität.....	63

Tabelle F.3 — Daten aus dem Ringversuch.....	64
Tabelle F.4 — Inklusivität und Exklusivität	64
Tabelle F.5 — Daten aus dem Ringversuch.....	65
Tabelle F.6 — Inklusivität und Exklusivität	65