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 *Campylobacter* ... 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 *Campylobacter*-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 *Campylobacter* 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 *Campylobacter* spp. 49
E.1 Allgemeines 49
E.2 Gelbasiertes Multiplex-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten *Campylobacter* 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 *Campylobacter* 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 *Campylobacter* spp. (siehe Anhang D) 63
F.2 Ringversuch zum gelbasierten Multiplex-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten *Campylobacter* spp. (siehe Abschnitt E.2) 63
F.3 Ringversuch zum Real-Time-PCR-Verfahren zur Bestätigung und Identifizierung von thermotoleranten *Campylobacter* spp. (siehe Abschnitt E.3) 65

Literaturhinweise 66

Bilder

Bild A.1 — Fließschema der Verfahren zum Nachweis von *Campylobacter* in der Lebensmittelkette 28

Tabellen

Tabelle 1 — Eigenschaften von *Campylobacter* 24

Tabelle 2 — Eigenschaften von *Campylobacter*-Spezies 26

Tabelle B.1 — Leistungsprüfung von Nährmedien für *Campylobacter* 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**