DIN EN ISO 21872-1:2023-06 (D)

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zur Bestimmung von Vibrio spp. - Teil 1: Nachweis von potentiell enteropathogenen Vibrio parahaemolyticus, Vibrio cholerae und Vibrio vulnificus (ISO 21872-1:2017 + Amd 1:2023); Deutsche Fassung EN ISO 21872-1:2017 + A1:2023

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort ... 10

A1 Europäisches Vorwort der Änderung 1 ... 11

Vorwort ... 12

A1 Vorwort der Änderung 1 ... 13

Einleitung ... 14

1 Anwendungsbereich ... 15

2 Normative Verweisungen ... 15

3 Begriffe ... 16

4 Kurzbeschreibung ... 16
4.1 Allgemeines ... 16
4.2 Primäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium ... 16
4.3 Sekundäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium ... 17
4.4 Isolierung und Identifizierung ... 17
4.5 Bestätigung ... 17

5 Nährmedien und Reagenzien ... 18
5.1 Anreicherungsmedium: alkalisches Peptonwasser (APW) ... 18
5.2 Festes selektives Isolierungsmedium ... 18
5.2.1 Erstes Medium: Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar-Medium ... 18
5.2.2 Zweites Medium ... 18
5.3 Kochsalz-Nähragar (SNA, en: Saline nutrient agar) ... 18
5.4 Reagenz für den Nachweis von Oxidase ... 18
5.5 Biochemische Untersuchungen ... 18
5.5.1 L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC) ... 18
5.5.2 Arginin-Dihydrolase-Salzmedium (ADH) ... 18
5.5.3 Reagenz für den Nachweis von β-Galactosidase ... 18
5.5.4 Salzmedium für den Nachweis von Indol ... 19
5.5.5 Salzhaltige Peptonwasser ... 19
5.5.6 Natriumchloridlösung ... 19
5.6 PCR ... 19
5.6.1 Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (oder ein Puffer mit für den Zweck vergleichbarer Leistung) ... 19
5.6.2 Mastermix ... 19
5.6.3 Primer und Sonden ... 19
5.6.4 Positives Kontrollmaterial ... 20
5.6.5 Negative Extraktionskontrolle ... 20

6 Geräte und Verbrauchsmaterialien ... 20

7 Probenahme ... 20

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe ... 21

9 Durchführung (siehe Bild A.1) ... 21

9.1 Prüfmenge und Erstverdünnung ... 21
9.2 Primäre selektive Anreicherung ... 22
9.3 Sekundäre selektive Anreicherung ... 22
9.4 Isolierung und Identifizierung ... 23
9.5 Bestätigung ... 23
9.5.1 Allgemeines ... 23
9.5.2 Auswahl der Kolonien für die Bestätigung und Herstellung von Reinkulturen ... 24
9.5.3 Untersuchungen zur präsumtiven Identifizierung ... 24
9.5.4 Biochemische Bestätigung ... 25
9.5.5 PCR-Bestätigung ... 27
9.5.6 DNA-Extraktion ... 28
9.5.7 Konventionelle PCR ... 28
9.5.8 Real-Time-PCR ... 29

10 Angabe der Ergebnisse ... 30

11 Leistungsmerkmale des Verfahrens ... 30
11.1 Ringversuch ... 30
11.2 Empfindlichkeit ... 30
11.3 Spezifität ... 30
11.4 LOD_{50} ... 30

12 Untersuchungsbericht ... 30

Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens ... 31

Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien und Reagenzien ... 33
B.1 Alkalisches Peptonwasser (APW) ... 33
B.1.1 Zusammensetzung ... 33
B.1.2 Herstellung ... 33
B.2 Thiosulfat-Citrat-Galle- und Saccharose-Agar (TCBS) ... 33
B.2.1 Zusammensetzung ... 33
B.2.2 Herstellung ... 34
B.2.3 Herstellung der Agarplatten ... 34
B.3 Kochsalz-Nähragar (SNA) ... 34
B.3.1 Zusammensetzung ... 34
B.3.2 Herstellung ... 34
B.3.3 Herstellung der Agarplatten ... 34
B.3.4 Herstellung der Schrägagarröhrchen mit Kochsalz-Nähragar ... 34
B.4 Reagenz für den Nachweis von Oxidase ... 35
B.4.1 Zusammensetzung ... 35
B.4.2 Herstellung ... 35
B.5 L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC) ... 35
B.5.1 Zusammensetzung ... 35
B.5.2 Herstellung ... 35
B.6 Arginin-Dihydrolase-Salzmedium (ADH) ... 35
B.6.1 Zusammensetzung ... 35
B.6.2 Herstellung ... 36
B.7 Nachweis von β-Galactosidase ... 36
B.7.1 ONPG-Lösung ... 36
B.7.2 Pufferlösung ... 36
B.7.3 Vollständiges Reagenz ... 36
B.8 Salzmedium für den Nachweis von Indol ... 37
B.8.1 Tryptophan-Salzmedium ... 37
B.8.2 Kovacs-Reagenz ... 37
B.9 Salzhaltiges Peptonwasser ... 37
B.9.1 Zusammensetzung ... 37
B.9.2 Herstellung ... 38
B.10 Natriumchloridlösung ... 38
B.10.1 Zusammensetzung ... 38

B.10.2 Herstellung ... **38**
B.11 Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer ... **38**
B.11.1 Zusammensetzung ... **38**
B.11.2 Herstellung ... **38**
B.12 Leistungsprüfung ... **38**

Anhang C (informativ) Konventionelle PCR für den Nachweis von *Vibrio parahaemolyticus*, Genen des thermostabilen direkten Hämolysins (*tdh*) und des thermostabilen direkten verwandten Hämolysins (*trh*), *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus* ... **43**
C.1 Zusammensetzung des Mastermix ... **43**
C.2 *Vibrio-parahaemolyticus*-Primer (konventionelle PCR) ... **43**
C.3 *Vibrio-parahaemolyticus*-Primer für Gene des thermostabilen direkten Hämolysins (*tdh*) und des thermostabilen direkten verwandten Hämolysins (*trh*) (konventionelle PCR) ... **44**
C.4 *Vibrio-cholerae*-Primer (konventionelle PCR) ... **44**
C.5 *Vibrio-vulnificus*-Primer (konventionelle PCR) ... **44**
C.6 Zyklusparameter — *VptoxR* und *VVH* ... **44**
C.7 Zyklusparameter — *prVC* ... **45**
C.8 Zyklusparameter — *tdh* und *trh* ... **45**
C.9 Kontrollmaterial — konventionelle PCR ... **45**
C.10 Ringversuch ... **46**

Anhang D (informativ) Real-Time-PCR für den Nachweis von *Vibrio parahaemolyticus*, dem Gen des thermostabilen direkten Hämolysins (*tdh*) und *Vibrio vulnificus* ... **48**
D.1 Zusammensetzung des Mastermix ... **48**
D.2 *Vibrio parahaemolyticus* — Primer und Hydrolyse-Sonden ... **48**
D.3 *Vibrio-parahaemolyticus* — Primer und Hydrolyse-Sonden für das Gen des thermostabilen direkten Hämolysins *(tdh*) ... **49**
D.4 *Vibrio vulnificus* — Primer und Hydrolyse-Sonden ... **49**
D.5 Zyklusparameter ... **49**
D.6 Kontrollmaterial — Real-Time-PCR ... **50**

Anhang E (informativ) Ergebnisse eines Ringversuchs ... **51**

Literaturhinweise ... **55**

Bilder

Bild A.1 — Fließschema des Verfahrens für den Nachweis von enteropathogenen *V. parahaemolyticus, V. cholerae* und *V. vulnificus* ... **32**

Tabellen

Tabelle 2 — Primäre Bebrütung und Zielspezies/Produktzustand ... **22**

Tabelle 3 — Sekundäre Bebrütung und Zielspezies/Produktzustand ... **22**

Tabelle 4 — Interpretation der biochemischen Untersuchungen ... **27**

Tabelle B.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien ... **39**

Tabelle B.2 — Leistungsprüfung von Bestätigungsmedien und Reagenzien ... **40**

Tabelle C.1 — Zusammensetzung des Mastermix ... **43**

Tabelle C.2 — Zyklusparameter — *VptoxR* und *VVH* ... **44**

Tabelle C.3 — Zyklusparameter — *prVC* **45**

Tabelle C.4 — Zyklusparameter — *tdh* und *trh* **45**

Tabelle C.5 — Referenzstämme **46**

Tabelle C.6 — Daten des Ringversuchs **47**

Tabelle D.1 — Zusammensetzung des Mastermix **48**

Tabelle D.2 — Zyklusparameter **49**

Tabelle D.3 — Referenzstämme **50**

Tabelle E.1 — Ergebnisse der Datenanalyse von *Vibrio parahaemolyticus* in rohen Austern **51**

Tabelle E.2 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalysen von *tdh* und *trh* für *Vibrio parahaemolyticus* in rohen Austern **52**

Tabelle E.3 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalyse mit *Vibrio vulnificus* in rohen Austern **52**

Tabelle E.4 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalyse mit *Vibrio cholerae* in gekochten Garnelen **53**

Tabelle E.5 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalyse mit *Vibrio vulnificus* in gekochten Garnelen **53**

Tabelle E.6 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalyse mit *Vibrio parahaemolyticus* in gekochten Garnelen **54**