

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 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>, Genen des thermostabilen direkten Hämolysins (<i>tdh</i>) und des thermostabilen direkten verwandten Hämolysins (<i>trh</i>), <i>Vibrio cholerae</i> und <i>Vibrio vulnificus</i>..... | | |
| C.1 | Zusammensetzung des Mastermix..... | 43 |
| C.2 | <i>Vibrio-parahaemolyticus</i> -Primer (konventionelle PCR)..... | 43 |
| C.3 | <i>Vibrio-parahaemolyticus</i> -Primer für Gene des thermostabilen direkten Hämolysins (<i>tdh</i>) und des thermostabilen direkten verwandten Hämolysins (<i>trh</i>) (konventionelle PCR) | 44 |
| C.4 | <i>Vibrio-cholerae</i> -Primer (konventionelle PCR) | 44 |
| C.5 | <i>Vibrio-vulnificus</i> -Primer (konventionelle PCR) | 44 |
| C.6 | Zyklusparameter — <i>VptoxR</i> und <i>VVH</i> | 44 |
| C.7 | Zyklusparameter — <i>prVC</i> | 45 |
| C.8 | Zyklusparameter — <i>tdh</i> und <i>trh</i> | 45 |
| C.9 | Kontrollmaterial — konventionelle PCR | 45 |
| C.10 | Ringversuch..... | 46 |
| Anhang D (informativ) Real-Time-PCR für den Nachweis von <i>Vibrio parahaemolyticus</i>, dem Gen des thermostabilen direkten Hämolysins (<i>tdh</i>) und <i>Vibrio vulnificus</i> | | |
| D.1 | Zusammensetzung des Mastermix..... | 48 |
| D.2 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> — Primer und Hydrolyse-Sonden..... | 48 |
| D.3 | <i>Vibrio-parahaemolyticus</i> — Primer und Hydrolyse-Sonden für das Gen des thermostabilen direkten Hämolysins (<i>tdh</i>) | 49 |
| D.4 | <i>Vibrio vulnificus</i> — Primer und Hydrolyse-Sonden | 49 |
| D.5 | Zyklusparameter | 49 |
| D.6 | Kontrollmaterial — Real-Time-PCR..... | 50 |
| Anhang E (informativ) Ergebnisse eines Ringversuchs..... | | |
| Literaturhinweise | | 55 |

Bilder

| | | |
|----------|--|----|
| Bild A.1 | — Fließschema des Verfahrens für den Nachweis von enteropathogenen <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> und <i>V. vulnificus</i> | 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 — <i>VptoxR</i> und <i>VVH</i> | 44 |

| | |
|--|----|
| Tabelle C.3 — Zyklusparameter — <i>prVC</i> | 45 |
| Tabelle C.4 — Zyklusparameter — <i>tdh</i> und <i>trh</i> | 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 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in rohen Austern | 51 |
| Tabelle E.2 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalysen von <i>tdh</i> und <i>trh</i> für <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in rohen Austern | 52 |
| Tabelle E.3 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalyse mit <i>Vibrio vulnificus</i> in rohen Austern..... | 52 |
| Tabelle E.4 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalyse mit <i>Vibrio cholerae</i> in gekochten Garnelen..... | 53 |
| Tabelle E.5 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalyse mit <i>Vibrio vulnificus</i> in gekochten Garnelen..... | 53 |
| Tabelle E.6 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalyse mit <i>Vibrio parahaemolyticus</i> in gekochten Garnelen | 54 |