

# E DIN EN ISO 13136-1:2024-03 (D/E)

Erscheinungsdatum: 2024-02-16

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Nachweis, Isolierung und Charakterisierung von Shiga-Toxin bildenden Escherichia coli (STEC) - Teil 1: Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Isolierung von Shiga-Toxin bildenden Escherichia coli (STEC) (ISO/DIS 13136-1:2024); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 13136-1:2024**

**Microbiology of the food chain - Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) - Part 1: Horizontal method for the detection and isolation of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) (ISO/DIS 13136-1:2024); German and English version prEN ISO 13136-1:2024**

---

<b>Inhalt</b>	<b>Seite</b>
Europäisches Vorwort.....	9
Vorwort.....	10
Einleitung.....	11
1 Anwendungsbereich.....	12
2 Normative Verweisungen.....	12
3 Begriffe.....	13
4 Kurzbeschreibung.....	13
4.1 Allgemeines.....	13
4.2 Mikrobielle Anreicherung.....	13
4.3 Nukleinsäureextraktion.....	14
4.4 Ziel-Gene.....	14
4.5 Nachweis und Isolierung.....	14
5 Kulturmedien und Reagenzien.....	15
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien.....	15
7 Probenahme.....	16
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe.....	16
9 Durchführung.....	16
9.1 Einwaage und Erstverdünnung.....	16
9.2 Anreicherung.....	17
9.3 Nukleinsäureextraktion.....	17
9.4 Amplifikation mittels PCR (Real-time-PCR).....	17
9.4.1 Allgemeines.....	17
9.4.2 Auswertung von PCR-Ergebnissen.....	18
9.4.3 Interne Amplifikationskontrolle bei der Real-time-PCR.....	18
9.5 Isolierung der STEC-Stämme.....	18
10 Auswertung.....	21
11 Validierung des Verfahrens.....	21
12 Untersuchungsbericht.....	22
13 Qualitätssicherung.....	22
Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens.....	24
Anhang B (normativ) Kulturmedien und Reagenzien.....	25

B.1	Allgemeines.....	25
B.2	Gepuffertes Peptonwasser (BPW) .....	25
B.2.1	Zusammensetzung.....	25
B.2.2	Herstellung.....	25
B.3	Trypton-Galle-X-Glucuronid-Agar (TBX).....	26
B.3.1	Zusammensetzung.....	26
B.3.2	Herstellung.....	26
B.3.3	Herstellung der TBX-Agarplatten .....	26
B.4	Nähragar (Beispiel für ein nicht selektives Medium).....	27
B.4.1	Zusammensetzung.....	27
B.4.2	Herstellung.....	27
B.4.3	Herstellung der Nähragarplatten.....	27
B.5	Trypticase-Soja-Bouillon-Hefeextrakt (TSBYE) (optional, siehe Verfahren in Anhang F) .....	27
B.5.1	Zusammensetzung.....	27
B.5.2	Herstellung.....	28
B.6	Leistungsprüfung .....	28
Anhang C (normativ) Fließschema für die Isolierung von STEC-Stämmen.....		30
Anhang D (normativ) Primer und Sonden für die Real-time-PCR-Assays .....		31
D.1	Allgemeines.....	31
D.2	Primer und Sonden.....	31
Anhang E (informativ) Identifizierung von Shiga-Toxin bildenden <i>Escherichia coli</i> (STEC) durch Amplifikation von Virulenzgenen mittels Multiplex-PCR und Nachweis von PCR- Produkten mit Agarose-Gelelektrophorese .....		32
E.1	Allgemeines.....	32
E.2	Abkürzungen .....	32
E.3	Durchführung.....	32
E.3.1	Kurzbeschreibung des Verfahrens .....	32
E.3.2	Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien.....	33
E.3.3	Reagenzien und Medien .....	34
E.3.4	Sicherheits- und Schutzvorrichtungen.....	34
E.3.5	Referenzstämmen und Prozesskontrolle .....	34
E.3.6	Vorbereitung des PCR-Templates.....	34
E.3.7	Durchführung der PCR-Reaktion .....	35
E.3.8	Agarosegel-Elektrophorese .....	35
E.3.9	Auswertung.....	35
Anhang F (informativ) Säurebehandlung der Anreicherungskulturen .....		37
Anhang G (informativ) Nachweis von <i>Escherichia coli</i> , die den Stx2f-Subtyp bilden, mittels Real- time-PCR (Auszug aus dem Verfahren EURL-VTEC_Method_10 [5]) .....		38
G.1	Allgemeines.....	38
G.2	Real-time-PCR für den Nachweis von <i>stx2f</i> .....	38
G.3	Isolierung von Stx2f-bildenden <i>E.-coli</i> -Stämmen.....	39
Literaturhinweise .....		41

## Bilder

Bild A.1	— Diagramm des Verfahrens zum Nachweis von Shiga-Toxin bildenden <i>Escherichia coli</i> (STEC) .....	24
Bild C.1	— Ablaufschema des Verfahrens zur Isolierung von STEC-Stämmen.....	30
Bild G.1	— Fließschema des Verfahrens.....	40

## **Tabellen**

<b>Tabelle 1 — Empfindlichkeit der Real-time-PCR-Assays für <i>stx1/stx2</i> nach Bebrütung von Anreicherungskulturen bei zwei Temperaturen (Screening-Schritt).....</b>	<b>21</b>
<b>Tabelle 2 — Für den Isolierungsschritt berechnete Empfindlichkeit.....</b>	<b>22</b>
<b>Tabelle B.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien und Reagenzien.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle D.1 — Degenerierte Primer und Sonden, die für 5'-Nuklease-PCR-Assays verwendet werden .....</b>	<b>31</b>
<b>Tabelle E.1 — Amplifikationsfragmente der zu erwartenden Größe .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabelle G.1 — Primer und TaqMan®<sup>a</sup>-Sonde, die für die vom EURL für <i>E. coli</i> entwickelte 5'-Nuklease-PCR-Assays verwendet werden .....</b>	<b>38</b>
<b>Tabelle G.2 — Primer für den Nachweis des <i>stx2f</i>-Subtyps in gepoolten oder einzelnen Kolonien .....</b>	<b>39</b>