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

Inhalt

Seite

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 *Escherichia coli* (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 Referenzstämme 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 *Escherichia coli*, 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 *stx2f* ... **38**
G.3 Isolierung von Stx2f-bildenden *E.-coli*-Stämmen ... **39**

Literaturhinweise ... **41**

Bilder

Bild A.1 — Diagramm des Verfahrens zum Nachweis von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) ... **24**

Bild C.1 — Ablaufschema des Verfahrens zur Isolierung von STEC-Stämmen ... **30**

Bild G.1 — Fließschema des Verfahrens ... **40**

Tabellen

Tabelle 1 — Empfindlichkeit der Real-time-PCR-Assays für *stx1*/*stx2* nach Bebrütung von Anreicherungskulturen bei zwei Temperaturen (Screening-Schritt) 21

Tabelle 2 — Für den Isolierungsschritt berechnete Empfindlichkeit 22

Tabelle B.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien und Reagenzien 28

Tabelle D.1 — Degenerierte Primer und Sonden, die für 5'-Nuklease-PCR-Assays verwendet werden 31

Tabelle E.1 — Amplifikationsfragmente der zu erwartenden Größe 36

Tabelle G.1 — Primer und TaqMan®[a]-Sonde, die für die vom EURL für *E. coli* entwickelte 5'-Nuklease-PCR-Assays verwendet werden 38

Tabelle G.2 — Primer für den Nachweis des *stx2f*-Subtyps in gepoolten oder einzelnen Kolonien 39