DIN EN ISO 21872-1:2017-10 (D)

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

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort 4

Vorwort 5

Einleitung 6

1 Anwendungsbereich 7

2 Normative Verweisungen 7

3 Begriffe 8

4 Kurzbeschreibung 8
4.1 Allgemeines 8
4.2 Primäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium 8
4.3 Sekundäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium 9
4.4 Isolierung und Identifizierung 9
4.5 Bestätigung 9

5 Nährmedien und Reagenzien 10
5.1 Anreicherungsmedium: alkalisches Peptonwasser (APW) (en: alkaline saline peptone water (ASPW)) 10
5.2 Festes selektives Isolierungsmedium 10
5.2.1 Erstes Medium: Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar-Medium (TCBS; en: thiosulfate citrate bile and sacrose agar) 10
5.2.2 Zweites Medium 10
5.3 Kochsalz-Nähragar (SNA, en: Saline nutrient agar) 10
5.4 Reagenz für den Nachweis von Oxidase 11
5.5 Biochemische Untersuchungen 11
5.5.1 L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC) 11
5.5.2 Arginin-Dihydroxylase-Salzmedium (ADH) 11
5.5.3 Reagenz für den Nachweis von β-Galactosidase 11
5.5.4 Salzmedium für den Nachweis von Indol 11
5.5.5 Salzhaltige Peptonwasser 11
5.5.6 Natriumchloridlösung 11
5.6 PCR 11
5.6.1 Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (oder ein Puffer mit für den Zweck vergleichbarer Leistung) 11
5.6.2 Mastermix 11
5.6.3 Primer und Sonden 11
5.6.4 Positives Kontrollmaterial 12
5.6.5 Negative Extraktionskontrolle 12

6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien 12

7 Probenahme 13

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe 13

9 Durchführung (siehe Bild A.1) 13
9.1 Prüfmenge und Erstverdünnung 13

9.2 Primäre selektive Anreicherung 14
9.3 Sekundäre selektive Anreicherung 14
9.4 Isolierung und Identifizierung 15
9.5 Bestätigung 15
9.5.1 Allgemeines 15
9.5.2 Auswahl der Kolonien für die Bestätigung und Herstellung von Reinkulturen 16
9.5.3 Untersuchungen zur präsumtiven Identifizierung 16
9.5.4 Biochemische Bestätigung 17
9.5.5 PCR-Bestätigung 19
9.5.6 DNA-Extraktion 19
9.5.7 Konventionelle PCR 20
9.5.8 Real-time-PCR 20

10 Angabe der Ergebnisse 21

11 Leistungsmerkmale des Verfahrens 21
11.1 Ringversuch 21
11.2 Empfindlichkeit 21
11.3 Spezifität 21
11.4 LOD_{50} 21

12 Untersuchungsbericht 22

Anhang A (normativ) Fließschemata des Verfahrens 23

Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien und Reagenzien 25

Anhang C (informativ) Konventionelle PCR für den Nachweis von *Vibrio parahaemolyticus*, Genen des direkten thermostabilen Hämolysins (*tdh*) und des direkten thermostabilen verwandten Hämolysins (*trh*), *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus* 31

Anhang D (informativ) Real-time-PCR für den Nachweis von *Vibrio parahaemolyticus*, dem Gen des direkten thermostabilen Hämolysins (*tdh*) und *Vibrio vulnificus* 36

Anhang E (informativ) Ergebnisse eines Ringversuchs 39

Literaturhinweise 43