

DIN EN ISO 21872-1:2017-10 (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); 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 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , Genen des direkten thermostabilen Hämolysins (<i>tdh</i>) und des direkten thermostabilen verwandten Hämolysins (<i>trh</i>), <i>Vibrio cholerae</i> und <i>Vibrio vulnificus</i>		31
Anhang D (informativ) Real-time-PCR für den Nachweis von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , dem Gen des direkten thermostabilen Hämolysins (<i>tdh</i>) und <i>Vibrio vulnificus</i>		36
Anhang E (informativ) Ergebnisse eines Ringversuchs.....		39
Literaturhinweise		43