

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