

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln
**Horizontales Verfahren zum Nachweis von präsuntiv
pathogenen *Yersinia enterocolitica***
(ISO 10273:2003) Deutsche Fassung EN ISO 10273:2003

DIN
EN ISO 10273

ICS 07.100.30

Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method
for the detection of presumptive pathogenic *Yersinia enterocolitica*
(ISO 10273:2003); German version EN ISO 10273:2003

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche
de *Yersinia enterocolitica* présumées pathogènes (ISO 10273:2003);
Version allemande EN ISO 10273:2003

Die Europäische Norm EN ISO 10273:2003 hat den Status einer Deutschen Norm.

Nationales Vorwort

Die Europäische Norm EN ISO 10273:2003 enthält unverändert die Internationale Norm ISO 10273, die vom SC 9 „Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln“ (Sekretariat: Frankreich) des Technischen Komitees ISO/TC 34 „Lebensmittelerzeugnisse“ (Sekretariat: Ungarn) erarbeitet wurde. Aufgrund der Ergebnisse der parallelen Abstimmung im Rahmen der Wiener Vereinbarung ist diese Norm ebenso als Europäische Norm EN ISO 10273:2003 erschienen.

Die Mitarbeit des DIN im SC 9 des ISO/TC 34 und in der Arbeitsgruppe 6 des CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ wird über den Arbeitsausschuss „Mikrobiologische Lebensmitteluntersuchung einschließlich Schnellverfahren“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Für die im Abschnitt 2 zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 6887 (alle Teile) siehe DIN EN ISO 6887 (alle Teile)

ISO 8261 siehe DIN EN ISO 8261

ISO/TS 11133-1 siehe DIN V ENV ISO 11133-1

Fortsetzung Seite 2
und 35 Seiten EN

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im
DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 6887 (alle Teile), *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen*.

DIN EN ISO 8261, *Milch und Milchprodukte – Allgemeiner Leitfaden für die Vorbereitung von Untersuchungsproben und die Herstellung von Anschüttelungen und Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 8261:2001); Deutsche Fassung EN ISO 8261:2001*.

DIN V ENV ISO 11133-1, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Anleitungen für die Zubereitung und Herstellung von Nährmedien – Teil 1: Allgemeine Anleitungen für die Qualitätssicherung bei der Zubereitung von Nährmedien im Laboratorium (ISO/TS 11133-1:2000); Deutsche Fassung ENV ISO 11133-1:2000*.

Deutsche Fassung

Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln -
Horizontales Verfahren zum Nachweis von präsumtiv
pathogenen *Yersinia enterocolitica* (ISO 10273:2003)

Microbiology of food and animal feedings stuffs - Horizontal
method for the detection of presumptive pathogenic
Yersinia enterocolitica (ISO 10273:2003)

Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la
recherche de *Yersinia enterocolitica* présumées
pathogènes (ISO 10273:2003)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 20. Mai 2003 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, der Slowakei, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn und dem Vereinigten Königreich.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort.....	3
Einleitung.....	3
1 Anwendungsbereich.....	4
2 Normative Verweisungen.....	4
3 Begriffe	4
4 Kurzbeschreibung	4
5 Chemikalien und Nährmedien	5
6 Geräte und Hilfsmittel.....	7
7 Probenahme	8
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	8
9 Durchführung	8
10 Untersuchungsbericht.....	14
Anhang A (normativ) Verfahrensdiagramm.....	15
Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung von Nährmedien und Reagenzien	16
Anhang C (informativ) Biochemische Differenzierung von <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> und biochemisch verwandter Spezies bei 30 °C.....	32
Anhang D (informativ) (Biotypisierung) von <i>Yersinia enterocolitica</i>	33
Literaturhinweise	34
Anhang ZA (normativ) Normative Verweisungen auf internationale Publikationen mit ihren entsprechenden europäischen Publikationen	35

Vorwort

Dieses Dokument EN ISO 10273:2003 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Food analysis – Horizontal methods“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Dezember 2003, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2003 zurückgezogen werden.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Slowakei, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn und Vereinigtes Königreich.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 10273:2003 wurde vom CEN als EN ISO 10273:2003 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

ANMERKUNG Die normativen Verweisungen auf Internationale Normen sind im Anhang ZA (normativ) aufgeführt.

Einleitung

Wegen der großen Vielfalt von Lebensmitteln und Futtermitteln kann dieses horizontale Verfahren nicht bis ins Einzelne für bestimmte Produkte geeignet sein. In diesem Fall dürfen unterschiedliche Verfahren, die speziell auf diese Produkte zutreffen, angewendet werden, wenn dies aus fachlichen Gründen absolut notwendig ist. Dennoch sollte stets versucht werden, den vorgegebenen Regeln so weit wie möglich zu folgen.

Bei der nächsten Überarbeitung dieser Internationalen Norm werden sämtliche dann zur Verfügung stehenden Informationen über die Akzeptanz dieser Norm und die Gründe für Abweichungen bei einzelnen Produkten berücksichtigt werden.

Die Harmonisierung von Untersuchungsverfahren kann nicht sofort erfolgen. Für bestimmte Produktgruppen können bereits Internationale Normen und/oder nationale Normen vorliegen, die diesem horizontalen Verfahren nicht entsprechen. Es ist jedoch anzustreben, sie bei einer Überarbeitung an diese Internationalen Norm anzupassen, so dass es sich bei den noch verbleibenden Abweichungen nur um solche handelt, die fachlich begründet sind.

WARNUNG — Bei der Anwendung dieser Norm ist es möglich, dass gefährliche Substanzen, Arbeitsgänge und Geräte angewendet werden. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders dieser Norm, geeignete Vorkehrungen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und vor der Anwendung festzulegen, welche einschränkenden Vorschriften gelten.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein horizontales Verfahren zum Nachweis von präsumtiv pathogenen *Yersinia enterocolitica* fest. Diese Internationale Norm gilt für

- Erzeugnisse, die für den menschlichen Verzehr oder als Futtermittel bestimmt sind,
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und der Behandlung von Lebensmitteln.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich Änderungen).

ISO 6887 (alle Teile), *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination*.

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for microbiological examinations and Amd. 1:2001*.

ISO 8261, *Milk and milk products — General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination*.

ISO/TS 11133-1, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory*.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

präsumtiv pathogene *Yersinia enterocolitica*

psychrotrophe Bakterien, die auf festen selektiven Medien charakteristische Kolonien bilden und deren biochemische Merkmale mit den beschriebenen Pathogenitätskriterien übereinstimmen, wenn nach dieser Internationalen Norm untersucht wird

3.2

Nachweis von präsumtiv pathogenen *Yersinia enterocolitica*

Bestimmung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins dieser Bakterien in einer definierten Produktmenge bei Prüfung nach dieser Internationalen Norm

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Der Nachweis von präsumtiv pathogenen *Yersinia enterocolitica* erfordert die drei im Anschluss aufgeführten aufeinander folgende Schritte.

4.2 Anreicherung in selektiven flüssigen Medien

Die Probeneinwaage wird in zwei Anreicherungsmedien verbracht:

- Pepton-Sorbit-Gallensalz-Bouillon (PSB-Bouillon) und
- IrgasanTM-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Bouillon (ITC-Bouillon).

Die ITC-Bouillon wird 48 h und die PSB-Bouillon 3 bis 5 Tage bei jeweils 25 °C bebrütet.

ANMERKUNG Die Anreicherung in ITC-Bouillon zur Isolierung von *Yersinia enterocolitica* Biovar 4/Serovar O:3 wurde vorgeschlagen (siehe Literaturhinweise [1]), nicht aber für Biovar 1B/Serovar O:8, Biovar 2/Serovar O:9 (siehe Literaturhinweise [2]), Biovar 2/Serovar O:5,27. Die Isolierung von *Yersinia enterocolitica* Biovar 2/Serovar O:9 erfordert die Verwendung eines ITC-Mediums ohne Chlorat, das 80 % der Originalkonzentration von Magnesiumchlorid und Malachitgrün enthält (siehe Literaturhinweise [3]).

4.3 Ausstreichen und Identifizieren

Die nach 4.2 gewonnenen Kulturen werden auf zwei feste Selektivmedien verimpft:

- Agar mit Cefsulodin, IrgasanTM und Novobiocin (CIN-Agar) (siehe Literaturhinweise [7]),
- *Salmonella-Shigella*-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumchlorid (SSDC-Agar).

Die Medien werden bei 30 °C bebrütet und nach 24 h bzw. bei Bedarf nach 48 h in Abhängigkeit vom Medium auf die Anwesenheit charakteristischer Kolonien von *Yersinia enterocolitica* geprüft.

4.4 Bestätigung

Die auf den Platten gewachsenen Kolonien werden visuell auf das Vorhandensein präsumtiver *Yersinia enterocolitica* hin untersucht. Es folgen die biochemische Bestätigung, Prüfungen zur Biotypisierung, Prüfung zur Feststellung der Pathogenitätskriterien und möglicherweise serologische Untersuchungen.

5 Chemikalien und Nährmedien

Zur üblichen Laborpraxis siehe ISO 7218.

Zu spezifischen Anforderungen an die Qualitätssicherung und Leistung von Nährmedien siehe ISO/TS 11133-1.

ANMERKUNG ISO/TS 11133-2 über praktische Anleitungen zur Leistungsprüfung von Nährmedien ist in Vorbereitung.

Wegen der Vielzahl der Nährmedien und Chemikalien werden der Übersicht halber deren Zusammensetzungen in Anhang B aufgeführt. Anhang B enthält auch detaillierte Beschreibungen zur Zubereitung, Lagerung usw.

5.1 Anreicherungsmedien

5.1.1 Pepton-Sorbit-Gallensalz-Bouillon (PSB-Bouillon)

Siehe B.1.

5.1.2 IrgasanTM-Ticarcillin-Kaliumchlorat-Bouillon (ITC-Bouillon)

Siehe B.2.

5.2 Feste Medien

5.2.1 Cefsulodin-IrgasanTM-Novobiocin-Agar (CIN-Agar) [7]

Siehe B.3.

5.2.2 *Salmonella-Shigella*-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumchlorid (SSDC-Agar)

Siehe B.4.

5.2.3 Nähragar

Siehe B.5.

5.3 Medien und Chemikalien für die Identifizierung

5.3.1 Harnstoff-Indol-Medium

Siehe B.6.

5.3.2 Reagenz zum Indolnachweis

Siehe B.7.

5.3.3 Kligler-Agar

Siehe B.8.

5.3.4 Reagenz zum Oxidasenachweis

Siehe B.9.

5.3.5 Medien zur Decarboxylierung

5.3.5.1 Lysindecaboxylase-Medium

Siehe B.10.

5.3.5.2 Ornithindecaboxylase-Medium

Siehe B.11.

5.3.6 Medien zur Kohlenhydratvergärung (Saccharose, Rhamnose, Trehalose und Xylose)

Siehe B.12.

5.3.7 Simmons-Citrat-Medium

Siehe B.13.

5.3.8 TweenTM-Esterase-Medium

Siehe B.14.

5.3.9 Galle-Äskulin-Agar

Siehe B.15.

5.3.10 Casein-Soja-Agar

Siehe B.16.

5.3.11 Casein-Soja-Agar zum Pyrazinamidasenachweis

Siehe B.17.

5.3.12 Eisen(II)-ammoniumsulfatlösung zum Pyrazinamidase-nachweis

Siehe B.18.

5.3.13 Casein-Soja-Agar, mit Magnesium und Oxalat.

Siehe B.19.

5.4 Kochsalzlösung

Siehe B.20.

5.5 Kaliumhydroxid in Kochsalzlösung

Siehe B.21.

5.6 Fleischextraktbouillon (Kalbfleisch)

Siehe B.22.

5.7 Steriles Glycerin

Siehe B.23.

6 Geräte und Hilfsmittel

Einmalgeräte mit geeigneter Spezifikation sind eine geeignete Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

Die übliche mikrobiologische Laborausrüstung und im besonderen folgende Geräte:

6.1 Geräte für die Trockensterilisierung (Wärmeschrank) oder Dampfsterilisierung (Autoklav), siehe ISO 7218.

6.2 Brutschrank, regelbar auf $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ und $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

6.3 Trockenschrank oder Wärmeschrank, durch Umluft regelbar zwischen $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ und $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$.

6.4 Wasserbäder oder Brutschränke, regelbar auf $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ und $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, vorzugsweise mit einer geeigneten Umwälzvorrichtung.

6.5 Wasserbad, regelbar auf 44°C bis 47°C .

6.6 Kulturröhrchen, 18 mm x 180 mm, 9 mm x 180 mm und 12 mm x 50 mm.

6.7 Flaschen und/oder Kolben, von geeignetem Nennvolumen.

6.8 Petrischalen aus Glas oder Kunststoff, Durchmesser 90 mm bis 100 mm.

6.9 Totalauslaufpipetten mit weiter Öffnung, Nennvolumen 1 ml und 10 ml, 0,1-ml-Skalenteilungswert.

6.10 Gummisauger oder andere mikrobiologisch sichere Pipettiersysteme.

6.11 Impfösen mit einem Durchmesser von etwa 3 mm, **gerade Impfnadeln** aus Platin-Iridium und/oder Chrom-Nickel, **Glasstäbe** und **Pasteur-Pipetten**.

Es dürfen sterile Einmalimpfösen oder -impfnadeln aus Kunststoff verwendet werden. Chrom-Nickel ist beim Oxidase-nachweis (siehe 9.4.3.5) nicht geeignet.

6.12 pH-Messgerät, Kalibrierengenauigkeit $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei 25°C .

6.13 Beleuchtung, zur Prüfung bei schrägem Durchlicht.

6.14 Vergrößerungsglas oder **Stereomikroskop**.

6.15 Beutel-Walkmischer.

7 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Labor eine repräsentative Probe erhält, die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

Das Einfrieren von Proben vor der Untersuchung wird nicht empfohlen, obgleich *Yersinia* spp. aus gefrorenen Produkten wiedergewonnen werden kann.

Die Probenahme wird in dieser Internationalen Norm nicht festgelegt. Falls keine spezifische Internationale Norm besteht, wird den Vertragspartnern empfohlen, eine Vereinbarung über die Probenahme zu treffen.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird in Übereinstimmung mit der für das entsprechende Produkt geeigneten spezifischen Internationalen Norm vorbereitet. Falls eine derartige spezifische Internationale Norm nicht besteht, wird den Vertragspartnern empfohlen, eine Vereinbarung über die Vorbereitung der Untersuchungsproben zu treffen.

9 Durchführung (siehe Anhang A)

9.1 Einwaage und Erstverdünnung

9.1.1 Siehe die relevanten Teile der ISO 6887, ISO 8261 und die spezifische, für die Untersuchungsprobe geeignete Internationale Norm.

9.1.2 Im Allgemeinen wird zur Herstellung der Erstverdünnung eine Menge (x) der Einwaage (von bekannter Masse bzw. Volumen) in ein bekanntes Volumen PSB-Bouillon (B.1) gegeben, wobei sich ein Verhältnis von Einwaage zum Anreicherungsmedium von 1 : 10 (Masse/Volumen oder Volumen/Volumen) ergibt. Die Suspension wird mittels eines Walkmischers (6.15) für 2 min homogenisiert.

9.1.3 Die zweite Erstverdünnung wird auf gleiche Weise in der ITC-Bouillon (B.2) hergestellt, jedoch in einem Verhältnis von Einwaage zum Anreicherungsmedium von 1 : 100 (Masse/Volumen oder Volumen/Volumen).

9.2 Anreicherung

Die beiden in 9.1.2 und 9.1.3 hergestellten Erstverdünnungen werden wie folgt bebrütet:

- a) PSB-Medium 48 h bis 72 h unter Schütteln oder 5 Tage ohne Schütteln bei 22 °C bis 25 °C;
- b) ITC-Medium 48 h bei 25 °C.

9.3 Ausstriche auf Nährböden und Identifizierung

9.3.1 Nach Bebrütung der Anreicherungsmedien (9.2) wird wie folgt vorgegangen:

9.3.2 Aus der PSB-Kultur (9.2) wird Kulturmedium mittels einer Impföse (6.11) auf der Oberfläche einer CIN-Agarplatte (B.3) so ausgestrichen, dass gut voneinander abgesetzte Kolonien entstehen.

9.3.3 Mittels einer sterilen Pipette (6.9) werden 0,5 ml aus der PSB-Kultur (9.2) in 4,5 ml Kaliumhydroxidlösung (B.21) übergeführt und durchmischt (siehe Literaturhinweise [5]). Nach (20 ± 5) s wird Kulturmedium unverzüglich mittels einer Impföse (6.11) auf der Oberfläche einer CIN-Agarplatte (B.3) so ausgestrichen, dass gut voneinander abgesetzte Kolonien entstehen.

9.3.4 Aus der ITC-Kultur (9.2) wird Kulturmedium mittels einer Impföse (6.11) auf der Oberfläche einer SSDC-Agarplatte (B.4) so ausgestrichen, dass gut voneinander abgesetzte Kolonien entstehen.

9.3.5 Die Agarplatten (9.3.2 bis 9.3.4) werden mit dem Deckel nach unten in den auf 30 °C eingestellten Brutschrank (6.2) verbracht.

9.3.6 Nach Bebrütung für 24 h werden die Platten mittels eines Vergrößerungsglases (6.14) mit möglichst schrägem Durchlicht (6.13) besichtigt, um die Anwesenheit charakteristischer Kolonien von *Yersinia enterocolitica* wie folgt festzustellen:

- a) Auf CIN-Agar sind charakteristische Kolonien von *Yersinia enterocolitica* klein (≤ 1 mm) und glatt mit rotem Zentrum und durchsichtigem Rand, bei Untersuchung im schrägen Durchlicht (6.13) irisieren sie nicht und sind fein granuliert.
- b) Auf SSDC-Agar sind charakteristische Kolonien von *Yersinia enterocolitica* klein (≤ 1 mm) und grau mit einem unscharfen Rand, bei Untersuchung im schrägen Durchlicht irisieren sie nicht und sind sehr fein granuliert.

ANMERKUNG Mit Hilfe von schrägem Durchlicht können charakteristische Kolonien von *Yersinia enterocolitica* besser von den sehr ähnlichen Kolonien von *Pseudomonas* unterschieden werden.

9.3.7 Wenn sich die Kolonien langsam entwickeln, die Färbung schwach ist oder keine charakteristischen Kolonien auftreten, werden die Platten weitere 48 h bebrütet und dann erneut untersucht.

9.4 Bestätigung

9.4.1 Allgemeines

Es dürfen biochemische miniaturisierte Identifizierungskits, die gegenwärtig kommerziell erhältlich sind und die Identifizierung von *Yersinia enterocolitica* ermöglichen, verwendet werden. Einige miniaturisierte biochemische Identifizierungskits identifizieren nicht mit Sicherheit *Yersinia*-Spezies wie *Yersinia mollaretii* und *Yersinia bercovieri* (ehemalige Biovare von *Yersinia enterocolitica* 3A und 3B) sowie *Yersinia intermedia*, die als *Yersinia enterocolitica* erkannt werden. In diesem letzten Fall müssen Mucat-Untersuchungen durchgeführt werden, um zwischen diesen Spezies unterscheiden zu können. Verbesserungen der Differenzierungsleistungen dieser miniaturisierten biochemischen Identifizierungskits sind vorgeschlagen worden (siehe Literaturhinweise [6] und [7]).

9.4.2 Auswahl von Kolonien für die Bestätigung

9.4.2.1 Zur Bestätigung werden von jeder Platte mit jedem Selektivmedium (siehe 9.3.2 bis 9.3.4) fünf charakteristische oder verdächtige Kolonien genommen.

Wenn sich auf einer Platte weniger als fünf charakteristische oder verdächtige Kolonien befinden, werden alle charakteristischen oder verdächtigen Kolonien zur Bestätigung verwendet.

Die ausgewählten Kolonien werden auf der Oberfläche von Nähragarplatten (B.5) so ausgestrichen, dass sich gut voneinander getrennte Kolonien entwickeln können.

Die beimpften Platten werden 24 h bei 30 °C bebrütet.

Danach werden die beimpften Platten auf die Reinheit der gewachsenen Kulturen untersucht. Falls Mischkulturen vorliegen, wird von jedem einzelnen Kolonietyp eine Subkultur auf Nähragarplatten angelegt und wie oben bebrütet.

Für die biochemischen Bestätigungsprüfungen und die Pathogenitätsprüfungen werden ausschließlich Reinkulturen verwendet.

9.4.2.2 Im Labor können bei Kultivierung über 30 °C oder bei zu langer Kultivierung und Lagerung unter 30 °C die Plasmide, denen die Pathogenität von *Yersinia* spp. zu Grunde liegt, spontan verloren gehen.

Um das zu vermeiden, sind die Kulturen gefroren aufzubewahren. Zuvor wird die jeweilige Reinkultur unverzüglich in Kalbfleischextraktbouillon (B.22) subkultiviert und 24 h bis 48 h bei 22 °C bis 25 °C bebrütet.

die Subkultur nach Zugabe von 10 % sterilem Glycerin (B.23) gut gemischt und dann vorzugsweise bei –70 °C eingefroren.

9.4.3 Orientierende Prüfung

9.4.3.1 Allgemeines

Die in 9.4.3.2 bis 9.4.3.4 genannten Medien werden mittels Impfdraht (6.10) mit Reinkulturen der nach 9.4.2 ausgewählten Kolonien beimpft. Es wird der Oxidasetest nach 9.4.3.5 durchgeführt.

9.4.3.2 Nachweis von Urease

Das flüssige Harnstoff-Indol-Medium (B.6) wird mit einem kräftigen Impfansatz knapp unterhalb der Oberfläche beimpft.

Es wird 24 h bei 30 °C bebrütet, vorzugsweise im Wasserbad.

Die positive Ureasereaktion wird durch eine rosaviolette oder rot-rosa Färbung angezeigt. *Yersinia enterocolitica* zeigt meist eine schnelle positive Ureasereaktion innerhalb von 1 min bis 5 min. Die Aufzeichnung der Geschwindigkeit einer positiven Reaktion kann von diagnostischem Wert sein.

Eine negative Ureasereaktion wird durch eine orange-gelbe Färbung angezeigt. Mögliche falsch negative Reaktionen können auftreten, wenn das Medium mit einer nicht ausreichenden Anzahl von Mikroorganismen beimpft wird.

9.4.3.3 Nachweis von Indol

Zum Nachweis von Indol werden 0,1 ml bis 0,2 ml des Reagens (B.7) in die Kulturröhrchen (9.4.3.2) gegeben.

Das Erscheinen eines roten Rings an der Oberfläche der Kultur innerhalb 15 min zeigt eine positive Reaktion an.

9.4.3.4 Kligler-Agar

Die Schrägfläche des Agars (B.8) wird im Ausstrich, der Hochschichtanteil als Stichkultur beimpft.

Es wird 24 h bis 48 h bei 30 °C bebrütet.

Die Veränderungen im Medium werden wie folgt bewertet:

a) Hochschichtagar

- gelb: glucosepositiv (Glucosevergärung),
- rot oder unverändert: glucosenegativ (keine Glucosevergärung),
- schwarz: Bildung von Hydrogensulfid,
- Blasen oder Spalten: Gasbildung aus Glucose;

b) Schrägfläche

- gelb: lactosepositiv (Lactoseabbau),
- rot oder unverändert: lactosenegativ (kein Lactoseabbau).

9.4.3.5 Oxidasenachweis

Mittels des Glasstabs oder der Platin-Iridium-Impföse (6.11) wird Material von jeder ausgewählten charakteristischen Kolonie (9.4.2) entnommen und auf mit dem Oxidasereagens (B.9) leicht befeuchtetem Filterpapier (ein