

DIN EN ISO 10273



ICS 07.100.30

Ersatz für
DIN EN ISO 10273:2003-12 und
DIN EN ISO 10273
Berichtigung 1:2007-05

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Horizontales Verfahren zum Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica* (ISO 10273:2017);
Deutsche Fassung EN ISO 10273:2017**

Microbiology of the food chain –
Horizontal method for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* (ISO 10273:2017);
German version EN ISO 10273:2017

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale pour la recherche de *Yersinia enterocolitica* pathogènes
(ISO 10273:2017);
Version allemande EN ISO 10273:2017

Gesamtumfang 53 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 10273:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ (Sekretariat: Frankreich) in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 6887 (alle Teile)	siehe DIN EN ISO 6887 (alle Teile)
ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 11133:2014	siehe DIN EN ISO 11133:2015-01
ISO 13307	siehe DIN EN ISO 13307
ISO 17468	siehe DIN EN ISO 17468
ISO 17604	siehe DIN EN ISO 17604
ISO/TS 17728	siehe DIN CEN ISO/TS 17728, DIN SPEC 10053
ISO 18593	siehe DIN EN ISO 18593
ISO/TS 18867:2015	siehe DIN CEN ISO/TS 18867, DIN SPEC 10056:2016-01

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 10273:2003-12 und DIN EN ISO 10273 Berichtigung 1:2007-05 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Zur Bestätigung pathogener *Y. enterocolitica* wurden Tests zur Pathogenität hinzugefügt oder präzisiert und in den Vordergrund gestellt. Demzufolge wurde das Wort „präsumtiv“ aus dem Titel gestrichen („pathogene *Y. enterocolitica*“), da die Norm verbindliche Tests zur Pathogenität enthält und die Unterscheidung von nicht pathogenen und pathogenen *Y. enterocolitica* ermöglicht;
- b) Direktkulturen auf Cefsulodin-IrgasanTM-Novobiocin(CIN)-Agar wurden hinzugefügt;
- c) die Bebrütungszeiten der Pepton-Sorbit-Gallensalz(PSB)-Anreicherungsbouillon und von CIN-Agar wurden geändert;
- d) die Beimpfungs- und die Bebrütungszeit der IrgasanTM-Ticarcillin-Kaliumchlorat(ITC)-Anreicherungsbouillon wurde geändert und präzisiert;
- e) Salmonella-Shigella-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumchlorid (SSDC-Agar) wurde durch CIN-Agar und optional ein chromogenes Medium ersetzt;
- f) die Beimpfung des CIN-Agars ohne vorherige Kaliumhydroxid(KOH)-Behandlung der Anreicherungsbouillon wurde in ein optionales Verfahren geändert (parallel zum Verfahren mit verbindlicher KOH-Behandlung);

- g) die Herstellung (und die Haltbarkeit) von KOH- und Eisen(II)-ammoniumsulfat-Lösungen wurde angegeben;
- h) verdächtige Kolonien einer Primärkultur werden auf CIN-Agar und (optional) auf chromogenem Agar ausgestrichen (gereinigt), um eine bessere Auswahl der charakteristischen Kolonien zu ermöglichen, bei denen eine weitere Bestätigung erforderlich ist. Für die Identifizierung charakteristischer Kolonien wird die Verwendung von Stereomikroskopen hervorgehoben;
- i) abgesehen von der Pyrazinamidaseprüfung können sämtliche biochemischen Bestätigungsprüfungen durch den Real-time-Polymerase-Kettenreaktion(PCR)-Nachweis des *ail*-Gens nach ISO/TS 18867 ersetzt werden;
- j) fünf Bestätigungsprüfungen (Indol, Trehalose, Xylose, Citrathydrolyse und Tween-Esterase) sind nun optional. Als weitere optionale Prüfung (zur Biotypisierung) wurde die Salicinprüfung hinzugefügt. Die Prüfung der Calciumabhängigkeit bei 37 °C wurde durch die Kongorot-Magnesium-Oxalat-Prüfung ersetzt. Drei Prüfungen (Oxidase, Kligler-Agar und Ornithin-Decarboxylase) wurden gestrichen;
- k) das Verfahren für die Kaltanreicherung von *Y. enterocolitica* wurde als Anhang D hinzugefügt;
- l) in Anhang C wurden die Leistungsprüfungen hinzugefügt;
- m) in Anhang B und Anhang D wurde die Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung von Kulturmedien hinzugefügt.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 10273: 2003-12

DIN EN ISO 10273 Berichtigung 1: 2007-05

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TS 17728, DIN SPEC 10053, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Probenahmetechniken für die mikrobiologische Untersuchung von Lebensmittel- und Futtermittelproben*

DIN CEN ISO/TS 18867, DIN SPEC 10056:2016-01, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Nachweis von pathogenen Yersinia enterocolitica und Yersinia pseudotuberculosis*

DIN EN ISO 6887 (alle Teile), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen*

DIN EN ISO 7218, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen*

DIN EN ISO 11133:2015-01, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Anleitungen für die Vorbereitung und Herstellung von Nährmedien (ISO 11133:2014, korrigierte Fassung 2014-11-01); Deutsche Fassung EN ISO 11133:2014*

DIN EN ISO 13307, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Primärproduktion — Probenahmetechniken*

DIN EN ISO 17468, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Technische Anforderungen und Leitfaden zur Einführung oder Überarbeitung eines genormten Referenzverfahrens*

DIN EN ISO 17604, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Probenahme von Schlachttierkörpern zur mikrobiologischen Untersuchung*

DIN EN ISO 18593, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen mittels Abklatschplatten und Tupfer*

Deutsche Fassung

Mikrobiologie der Lebensmittelkette —
Horizontales Verfahren zum Nachweis von
pathogenen *Yersinia enterocolitica*
(ISO 10273:2017)

Microbiology of the food chain —
Horizontal method for the detection of
pathogenic *Yersinia enterocolitica*
(ISO 10273:2017)

Microbiologie de la chaîne alimentaire —
Méthode horizontale pour la recherche de
Yersinia enterocolitica pathogènes
(ISO 10273:2017)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 13. März 2017 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 CEN-CENELEC-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, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Abkürzungen	9
5 Kurzbeschreibung	9
5.1 Allgemeines	9
5.2 Direktplattierung aus flüssigem Anreicherungsmedium	9
5.3 Anreicherung in flüssigem Anreicherungsmedium und in selektivem flüssigem Anreicherungsmedium	9
5.4 Ausplattierung nach Anreicherung und Identifizierung	10
5.5 Bestätigung	10
6 Nährmedien und Reagenzien	10
7 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien	10
8 Probenahme	11
9 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	11
10 Durchführung (wie in Anhang A dargestellt)	11
10.1 Prüfmenge und Erstverdünnung	11
10.2 Direktplattierung auf selektivem Agar	12
10.3 Anreicherung	12
10.4 Ausplattierung und Bebrütung von Platten	12
10.4.1 Ausplattierung von PSB und ITC nach KOH-Behandlung auf CIN-Agar	12
10.4.2 Ausplattierung von PSB und ITC nach KOH-Behandlung auf chromogenem Agar (optional)	12
10.5 Identifizierung charakteristischer Kolonien	13
10.6 Bestätigung	13
10.6.1 Allgemeines	13
10.6.2 Auswahl von Kolonien für die Bestätigung	13
10.6.3 Bestimmung von pathogenen <i>Yersinia</i> -Spezies	14
10.6.4 Bestätigung von pathogenen <i>Y. enterocolitica</i>	16
10.6.5 Auswertung der Bestätigungsprüfungen für <i>Y. enterocolitica</i>	18
10.6.6 Auswertung der Bestätigungsprüfungen für pathogene <i>Y. enterocolitica</i>	18
10.7 Biotypisierung von <i>Y. enterocolitica</i> (optional)	18
10.7.1 Allgemeines	18
10.7.2 Vergärung von Xylose	19
10.7.3 Tween-Esterase-Prüfung	19
10.7.4 Vergärung von Salicin (optional) und Trehalose	19
10.7.5 Bildung von Indol	19
10.7.6 Auswertung der Untersuchungen zur Biotypisierung	19
11 Angabe der Ergebnisse	20

12	Leistungsmerkmale des Verfahrens.....	20
12.1	Ringversuch.....	20
12.2	Empfindlichkeit.....	20
12.3	Spezifität.....	20
12.4	LOD ₅₀	21
13	Untersuchungsbericht.....	21
14	Qualitätssicherung.....	21
Anhang A (normativ) Verfahrensschema		22
Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung von Nährmedien und Reagenzien		24
Anhang C (informativ) Untersuchungen zur Methodenvalidierung und Leistungsmerkmale des Verfahrens.....		40
Anhang D (informativ) Verfahren mit Kaltanreicherung.....		43
Literaturhinweise.....		48

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 10273:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2017, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2017 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] ist/sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 10273:2003.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 10273:2017 wurde von CEN als EN ISO 10273:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der freiwilligen Natur von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Europäischen Komitee für Normung (CEN) Technischen Komitee CEN/TC 275, *Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren*, in Zusammenarbeit mit dem ISO Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Diese dritte Ausgabe annulliert und ersetzt die zweite Ausgabe (ISO 10273:2003), die technisch überarbeitet wurde. Die wichtigsten Änderungen sind:

- Zur Bestätigung pathogener *Y. enterocolitica* wurden Tests zur Pathogenität hinzugefügt oder präzisiert und in den Vordergrund gestellt. Demzufolge wurde das Wort „präsumtiv“ aus dem Titel gestrichen („pathogene *Y. enterocolitica*“), da die Norm verbindliche Tests zur Pathogenität enthält und die Unterscheidung von nicht pathogenen und pathogenen *Y. enterocolitica* ermöglicht.
- Direktkulturen auf Cefsulodin-Irgasan^{TM1}-Novobiocin(CIN)-Agar wurden hinzugefügt.
- Die Bebrütungszeiten der Pepton-Sorbit-Gallensalz(PSB)-Anreicherungsbouillon und von CIN-Agar wurden geändert.

1) IrgasanTM ist ein Beispiel eines geeigneten Produktes, das im Handel erhältlich ist. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses Produktes durch ISO.

- Die Beimpfungs- und die Bebrütungszeit der IrgasanTM-Ticarcillin-Kaliumchlorat(ITC)-Anreicherungsbouillon wurden geändert und präzisiert.
- Salmonella-Shigella-Agar mit Natriumdesoxycholat und Calciumchlorid (SSDC-Agar) wurde durch CIN-Agar und optional ein chromogenes Medium ersetzt.
- Die Beimpfung des CIN-Agars ohne vorherige Kaliumhydroxid(KOH)-Behandlung der Anreicherungsbouillon wurde in ein optionales Verfahren geändert (parallel zum Verfahren mit verbindlicher KOH-Behandlung).
- Die Herstellung (und die Haltbarkeit) von KOH- und Eisen(II)-ammoniumsulfat-Lösungen wurde angegeben.
- Verdächtige Kolonien einer Primärkultur werden auf CIN-Agar und (optional) auf chromogenem Agar ausgestrichen (gereinigt), um eine bessere Auswahl der charakteristischen Kolonien zu ermöglichen, bei denen eine weitere Bestätigung erforderlich ist. Für die Identifizierung charakteristischer Kolonien wird die Verwendung von Stereomikroskopen hervorgehoben.
- Abgesehen von der Pyrazinamidaseprüfung können sämtliche biochemischen Bestätigungsprüfungen durch den Real-time-Polymerase-Kettenreaktion(PCR)-Nachweis des *ail*-Gens nach ISO/TS 18867 ersetzt werden.
- Fünf Bestätigungsprüfungen (Indol, Trehalose, Xylose, Citrathydrolyse und Tween-Esterase) sind nun optional. Als weitere optionale Prüfung (zur Biotypisierung) wurde die Salicinprüfung hinzugefügt. Die Untersuchung der Calciumabhängigkeit bei 37 °C wurde durch die Kongorot-Magnesium-Oxalat-(CR-MOX-)Prüfung ersetzt. Drei Prüfungen (Oxidase, Kligler-Agar und Ornithin-Decarboxylase) wurden gestrichen.
- Das Verfahren für die Kaltanreicherung von *Y. enterocolitica* wurde als Anhang D hinzugefügt.
- In Anhang C wurden die Leistungsmerkmale hinzugefügt.
- In Anhang B und Anhang D wurde die Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung von Kulturmedien hinzugefügt.

Einleitung

Dieses Dokument legt ein horizontales Verfahren für den Nachweis der mit Erkrankungen des Menschen im Zusammenhang stehenden *Yersinia enterocolitica* fest. Aufgrund der großen Vielfalt an Lebens- und Futtermittelprodukten ist dieses horizontale Verfahren nicht unbedingt bis ins Detail für bestimmte Produkte geeignet. So können bei einigen anderen Produkten gegebenenfalls andere Verfahren erforderlich werden. Dennoch ist zu hoffen, dass stets versucht wird, dieses horizontale Verfahren so weit wie möglich umzusetzen und dass Abweichungen von diesem Verfahren nur dann vorgenommen werden, wenn dies aus technischer Sicht absolut notwendig ist.

Die wesentlichen im Vorwort aufgeführten Änderungen, die im Vergleich zu ISO 10273:2003 in dieses Dokument eingebracht wurden, werden als erheblich betrachtet (siehe ISO 17468).

Bei der nächsten Überarbeitung dieses Dokuments werden sämtliche dann zur Verfügung stehende Informationen über die Umsetzung dieses horizontalen Verfahrens 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 bestehen, die diesem horizontalen Verfahren nicht entsprechen. Es ist jedoch anzustreben, sie bei einer Überarbeitung an dieses Dokument anzupassen, so dass es sich bei den noch verbleibenden Abweichungen nur um solche handelt, die fachlich begründet sind.

WARNUNG — Um die Gesundheit des Laborpersonals sicherzustellen, ist es unerlässlich, dass Untersuchungen zum Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica* nur in ordnungsgemäß ausgestatteten Laboratorien unter Aufsicht eines erfahrenen Mikrobiologen vorgenommen werden und dass das gesamte bebrütete Material mit größter Sorgfalt entsorgt wird. Personen, die dieses Dokument anwenden, sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsaspekte angesprochen werden. Es obliegt der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Gesundheitsschutzmaßnahmen zu treffen und somit die Einhaltung der nationalen gesetzlichen Bestimmungen sicherzustellen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein horizontales Verfahren zum Nachweis der mit Erkrankungen des Menschen im Zusammenhang stehenden *Y. enterocolitica* fest. Es ist anwendbar auf

- Produkte, die für den menschlichen Verzehr oder als Futtermittel bestimmt sind, und
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung von Lebensmitteln und beim Umgang mit Lebensmitteln.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 6887 (alle Teile), *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*

ISO 11133:2014, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten folgende Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1
pathogene *Yersinia enterocolitica*
psychrotrophe Bakterien, die auf festen selektiven Medien charakteristische Kolonien bilden und deren biochemische und molekulare Merkmale mit den beschriebenen Pathogenitätskriterien übereinstimmen, wenn Bestätigungsprüfungen nach diesem Dokument durchgeführt werden

3.2

Nachweis von pathogenen *Yersinia enterocolitica*

Bestimmung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins pathogener *Yersinia enterocolitica* (3.1) in einer definierten Masse oder einem definierten Volumen des Produkts oder auf einer festgelegten Oberfläche bei der Untersuchung nach den in diesem Dokument festgelegten Verfahren

4 Abkürzungen

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten folgende Abkürzungen.

CEB	Kaltanreicherungsbouillon (en: cold enrichment broth)
CIN	Cefsulodin-Irgasan TM -Novobiocin
CR-MOX	Kongorot-Magnesium-Oxalat (en: congo red magnesium-oxalate)
ITC	Irgasan TM -Ticarcillin-Kaliumchlorat
KOH	Kaliumhydroxid
MRB	Modifizierte Rappaport-Bouillon (en: modified rappaport broth)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (en: polymerase chain reaction)
PSB	Pepton-Sorbit-Gallensalz
TSB	tryptische Soja-Bouillon
WDCM	Weltdatenzentrum für Mikroorganismen (en: World Data Centre for Microorganisms)

5 Kurzbeschreibung

5.1 Allgemeines

Der Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* erfordert vier aufeinander folgende Schritte (für ein Verfahrens- und Bestätigungsschema siehe Anhang A). Zusätzlich zum allgemeinen Verfahren, beispielsweise zur Aufklärung von Ausbruchsfällen, darf auch das im Anhang D beschriebene Verfahren mit Kaltanreicherung verwendet werden.

5.2 Direktplattierung aus flüssigem Anreicherungsmedium

Die Probe wird in einem flüssigen Anreicherungsmedium (PSB-Bouillon) homogenisiert. Anschließend werden zwei bis vier CIN-Agar-Platten [15] mit einer angegebenen Menge beimpft. Die beimpften Platten werden anschließend bei 30 °C für 24 h bebrütet.

ANMERKUNG Zusätzlich können auch weitere Platten, beispielsweise mit chromogenen Agarmedien zum Nachweis pathogener *Y. enterocolitica*, verwendet werden [9], [13], [18].

5.3 Anreicherung in flüssigem Anreicherungsmedium und in selektivem flüssigem Anreicherungsmedium

Eine angegebene Menge des beimpften PSB-Anreicherungsmediums (5.2) wird in ein selektives flüssiges Anreicherungsmedium ITC-Bouillon überführt [17]. Die ITC-Bouillon und die PSB-Erstverdünnung werden bei 25 °C für 44 h bebrütet.

5.4 Ausplattierung nach Anreicherung und Identifizierung

Unter Verwendung der in 5.3 erhaltenen Anreicherungen wird nach vorheriger Behandlung eine Oberflächenausplattierung auf CIN-Agar vorgenommen. Dazu wird zunächst eine angegebene Menge der Anreicherung (5.3, siehe Abschnitt 10 für das Verfahren) in eine 0,5 %ige KOH-Lösung überführt und nach Vermischen über eine festgelegte Zeitdauer (KOH-Behandlung oder alkaline Behandlung) auf eine CIN-Platte geimpft. Die beimpften Platten werden bei 30 °C für 24 h bebrütet. Charakteristische Kolonien pathogener *Y. enterocolitica* werden identifiziert (siehe 10.5) und die Morphologie der Kolonien wird als präsumtiv pathogene *Y. enterocolitica* durch schrittweise Kultivierung auf selektiven Platten (siehe 10.5) verifiziert.

ANMERKUNG Zusätzlich können weitere Platten, wie beispielsweise mit chromogenen Agarmedien zum Nachweis pathogener *Y. enterocolitica*, verwendet werden [9], [13],[18].

5.5 Bestätigung

Bei als präsumtiv pathogene *Y. enterocolitica* identifizierten Kolonien (5.2 und 5.4) wird anhand geeigneter biochemischer bzw. molekularer Bestätigungsprüfungen festgestellt, ob tatsächlich pathogene *Y. enterocolitica* vorliegen (siehe 10.6 sowie Bild A.2).

6 Nährmedien und Reagenzien

Zur üblichen Laborpraxis siehe ISO 7218.

Bezüglich Leistungsprüfungen von Nährmedien siehe ISO 11133 und Anhang B.

Die Zusammensetzung der Nährmedien und Reagenzien sowie deren Herstellung werden in Anhang B beschrieben. Alternativ dürfen auch vollständige Trockenmedien, Verdünnungs- oder gebrauchsfertige Medien verwendet werden. Die jeweiligen Anweisungen des Herstellers sind zu befolgen.

7 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

Geräte zum Einmalgebrauch mit geeigneten Kennwerten sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten. Übliche Geräte eines mikrobiologischen Labors (siehe ISO 7218) und insbesondere die folgenden Geräte:

7.1 Geräte für die Trockensterilisation (Heißluft-Sterilisator) oder Dampfsterilisation (Autoklav).

Wie in ISO 7218 festgelegt.

7.2 Brutschränke, nach ISO 7218, auf Temperaturen von $4\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ einstellbar.

7.3 Sterile Mischbeutel, Probenröhrchen, Flaschen und/oder Kolben, mit geeignetem Fassungsvermögen.

7.4 Petrischalen, mit einem Durchmesser von etwa 90 mm sowie (optional) große Petrischalen (Durchmesser etwa 140 mm).

7.5 Pipetten. Messpipetten oder automatische Pipetten, jeweils mit großer Öffnung, einem Nennvolumen von 1 ml und 10 ml und einer Skalenteilung von 0,1 ml und 0,5 ml sowie Pasteurpipetten.

7.6 Impfösen und Spatel. Sterile Impfösen, mit einem Durchmesser von etwa 6 mm (10 µl Volumen) und Impfnadel oder -draht. L- oder T-förmige Einmalspatel. Wattestäbchen (siehe optionale Angaben in Anhang D).

7.7 Stereomikroskop, ausgestattet mit Dunkelfeldbeleuchtung oder schräg (45°-Winkel) einfallendem Licht.

7.8 Beutel-Walkmischer.

8 Probenahme

Die Probenahme ist kein Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Siehe die spezifische Internationale Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst. Liegt keine spezifische Internationale Norm zur Probenahme des Produkts vor, wird den Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

Empfohlene Probenahmeverfahren sind in den folgenden Dokumenten angegeben:

- ISO/TS 17728 für Lebens- und Futtermittel;
- ISO 13307 für Proben aus der Primärproduktion;
- ISO 17604 für Schlachtkörper;
- ISO 18593 für Umgebungsproben.

Es ist wichtig, dass das Labor eine Probe erhält, die repräsentativ ist und die Probe sollte während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert worden sein.

9 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird nach der spezifischen Internationalen Norm, die dem betreffenden Produkt entspricht, vorbereitet. Liegt keine spezifische Internationale Norm vor, wird den Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

10 Durchführung (wie in Anhang A dargestellt)

10.1 Prüfmenge und Erstverdünnung

10.1.1 Siehe das relevante Dokument von ISO 6887 (alle Teile) oder eine spezifische für das betreffende Produkt geeignete Internationale Norm.

10.1.2 Das unter B.2 festgelegte Voranreicherungsmedium (PSB-Bouillon) wird im Allgemeinen als Verdünnungsmittel für die Herstellung der Erstverdünnung verwendet. Vor dem Gebrauch wird die PSB-Bouillon auf Raumtemperatur vorgewärmt.

Im Allgemeinen wird eine bestimmte Menge an Prüfmenge (Masse oder Volumen) so zu einer Menge an PSB (Masse oder Volumen) hinzugefügt, dass eine zehnfache Verdünnung erreicht wird. Hierfür werden 25 g Prüfmenge mit 225 ml PSB gemischt.

Die Suspension wird vorzugsweise mithilfe eines Beutel-Walkmischers (7.8) für 1 min homogenisiert.

Dieses Dokument wurde für Prüfmengen von 25 g bzw. 25 ml validiert. Eine kleinere Prüfmenge darf ohne weitere Validierung/Verifizierung verwendet werden, vorausgesetzt, dass zwischen der Anreicherungsbouillon und der Prüfmenge dasselbe Verhältnis beibehalten wird. Eine größere Prüfmenge als die ursprünglich validierte darf verwendet werden, wenn in einer Validierungs-/Verifizierungsstudie nachgewiesen wurde, dass keine nachteiligen Auswirkungen auf den Nachweis von pathogenen *Y. enterocolitica* vorliegen.

ANMERKUNG Die Validierung kann nach den entsprechenden Dokumenten von ISO 16140 (alle Teile) durchgeführt werden. Die Verifizierung bezüglich des Poolens (Bündelns) von Proben kann nach der in ISO 6887-1:2017, Anhang D (Verfahrensanweisung zur Verifizierung zum Poolen von Proben für qualitative Untersuchungen) beschriebenen Verfahrensanweisung durchgeführt werden.

10.1.3 Die selektive ITC-Anreicherungssuspension wird durch Überimpfen von 10 ml der PSB-Suspension (10.1.2) in 90 ml ITC-Bouillon (B.3) und anschließendes Durchmischen dieser hergestellt.

10.2 Direktplattierung auf selektivem Agar

Unter Verwendung der erhaltenen PSB-Erstverdünnung (10.1.2) wird ein Gesamtvolumen von 1 ml auf zwei bis vier CIN-Agarplatten (B.6) aufgeteilt und mit einem Spatel (7.6) auf den Platten ausgestrichen.

Die CIN-Platten werden mit dem Deckel nach unten in einem auf 30 °C (7.2) eingestellten Brutschrank für 24 h $\pm$ 2 h bebrütet.

ANMERKUNG 1 Vor der Beimpfung kann es erforderlich sein, die CIN-Agarplatten eine halbe Stunde lang trocknen zu lassen (z. B. in einer Sterilbank), damit das Inokulum vollständig vom Agar absorbiert werden kann.

ANMERKUNG 2 Die Anzahl der zu verwendenden CIN-Agarplatten richtet sich nach der erwarteten Höhe an Hintergrund-Mikroflora der Proben.

10.3 Anreicherung

Die Erstverdünnung wird in PSB (10.1.2) und in selektiver ITC-Anreicherungsbouillon (10.1.3) bei 25 °C (7.2) für 44 h $\pm$ 4 h (ohne Durchmischung) bebrütet.

10.4 Ausplattierung und Bebrütung von Platten

10.4.1 Ausplattierung von PSB und ITC nach KOH-Behandlung auf CIN-Agar

Mithilfe einer sterilen Pipette (7.5) werden 0,5 ml der PSB-Anreicherung (10.3) in 4,5 ml KOH-Lösung (B.5) (hergestellt am Tag vor der Verwendung) übergeführt und durchmischt [7]. 20 s $\pm$ 5 s nach der Zugabe der PSB-Anreicherung zur KOH-Lösung wird die Mischung mithilfe einer Impföse (7.6) so auf der Oberfläche einer CIN-Agarplatte (B.6) ausgestrichen, dass gut voneinander abgesetzte Kolonien entstehen. Dieses Verfahren wird mit der ITC-Anreicherung (10.3) wiederholt.

ANMERKUNG 1 Es ist für die Verfahrensleistung von entscheidender Bedeutung, die KOH-Lösung am Tag vor der Verwendung herzustellen, siehe Anhänge B und C.

Die CIN-Platten werden mit dem Deckel nach unten in einem auf 30 °C (7.2) eingestellten Brutschrank für 24 h $\pm$ 2 h bebrütet.

ANMERKUNG 2 Es kann zusätzlich von Vorteil sein, CIN-Agarplatten [mithilfe einer Impföse (7.6)] mit unbehandelten PSB und ITC (ohne KOH-Behandlung) zu beimpfen.

ANMERKUNG 3 Während der KOH-Behandlung wird die Anreicherung zehnfach verdünnt. Darüber hinaus kann diese Behandlung die Anzahl der pathogenen *Y. enterocolitica* in der Lösung verringern. Daher kann es in einigen Fällen vorteilhaft sein, eine weitere CIN-Platte mit 0,1 ml Inokulum zu beimpfen.

10.4.2 Ausplattierung von PSB und ITC nach KOH-Behandlung auf chromogenem Agar (optional)

Das Verfahren in 10.4.1 wird wiederholt. Nach der KOH-Behandlung wird die Oberfläche einer chromogenen Agarplatte [9], [13], [18] mithilfe einer Impföse (7.6) so beimpft, dass gut voneinander abgesetzte Kolonien entstehen.

Die chromogenen Platten werden nach den Anweisungen des Herstellers bebrütet.