

DIN EN ISO 11290-1



ICS 07.100.30

Ersatz für
DIN EN ISO 11290-1:2005-01

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von
Listeria monocytogenes und von *Listeria* spp. –
Teil 1: Nachweisverfahren (ISO 11290-1:2017);
Deutsche Fassung EN ISO 11290-1:2017**

Microbiology of the food chain –
Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of
Listeria spp. –
Part 1: Detection method (ISO 11290-1:2017);
German version EN ISO 11290-1:2017

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et
Listeria spp. –
Partie 1: Méthode de recherche (ISO 11290-1:2017);
Version allemande EN ISO 11290-1:2017

Gesamtumfang 49 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 11290-2:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

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

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 6887 (alle Teile)	siehe DIN EN ISO 6887 (alle Teile)
ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 11133	siehe DIN EN ISO 11133
ISO 16140 (alle Teile)	siehe DIN EN ISO 16140 (alle Teile)
ISO 18593	siehe DIN ISO 18593
ISO/TS 17728	siehe DIN CEN ISO/TS 17728 (DIN SPEC 10053)
ISO 17468	siehe DIN EN ISO 17468
ISO 16140:2003*	siehe DIN EN ISO 16140:2003-09*

Änderungen:

Gegenüber DIN EN ISO 11290-1:2005-01 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Nachweis von *Listeria monocytogenes* wurde wie unten aufgelistet geändert;
- b) erste Anreicherung in Halb-Fraser-Bouillon: Bebrütung für $25 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$;
- c) zweite Anreicherung in Fraser-Bouillon: Bebrütung für $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$;
- d) die Halb-Fraser-Bouillon und die Fraser-Bouillon dürfen vor dem Subkultivieren oder der Isolierung auf dem Selektivagar für eine Höchstdauer von 72 h gekühlt gelagert werden;
- e) Lagerung der Agarplatten: bebrütete Platten können vor der Ablesung für eine Höchstdauer von zwei Tagen gekühlt gelagert werden;
- f) das mikroskopische Aussehen für die Bestätigung ist optional, wenn der Isolierungs-Agar eine Unterscheidung zwischen pathogenen und nicht pathogenen *Listeria* spp. ermöglicht;
- g) der CAMP-Test und der Katalasetest sind optional;
- h) Einbeziehung neuer Leistungsmerkmale;
- i) darüber hinaus wurde der Nachweis von *Listeria* spp. in den Anwendungsbereich einbezogen und der Titel wurde entsprechend geändert;

* Zurückgezogene Norm.

j) das gesamte Dokument wurde redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 11290-1: 1997-03, 2005-1

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 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, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

DIN EN ISO 16140 (alle Teile), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung*

DIN EN ISO 16140:2003-09, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren (ISO 16140:2003); Deutsche Fassung EN ISO 16140:2003**

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

DIN ISO 18593, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen mittels Abklatschplatten und Tupfer*

Deutsche Fassung

Mikrobiologie der Lebensmittelkette —
Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von
Listeria monocytogenes und von *Listeria* spp. —
Teil 1: Nachweisverfahren
(ISO 11290-1:2017)

Microbiology of the food chain —
Horizontal method for the detection and enumeration
of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. —
Part 1: Detection method
(ISO 11290-1:2017)

Microbiologie de la chaîne alimentaire —
Méthode horizontale pour la recherche
et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*
et de *Listeria* spp. —
Partie 1: Méthode de recherche
(ISO 11290-1:2017)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 6. April 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	9
4 Kurzbeschreibung	9
4.1 Allgemeines	9
4.2 Erste Anreicherung in einem selektiven flüssigen Anreicherungsmedium mit verminderten Konzentrationen an selektiven Agenzien (Halb-Fraser-Bouillon)	10
4.3 Zweite Anreicherung in einem selektiven flüssigen Anreicherungsmedium mit vollständigen Konzentrationen an selektiven Agenzien (Fraser-Bouillon)	10
4.4 Ausplattierung und Identifizierung	10
4.5 Bestätigung	10
5 Nährmedien und Reagenzien	10
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien	10
7 Probenahme	11
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	11
9 Durchführung	11
9.1 Prüfmenge und Erstverdünnung	11
9.2 Erste Anreicherung	12
9.3 Zweite Anreicherung	12
9.4 Ausplattierung und Identifizierung	12
9.4.1 Allgemeines	12
9.4.2 Listerien-Agar nach Ottaviani und Agosti	13
9.4.3 Zweites Selektivmedium	13
9.5 Bestätigung von <i>Listeria monocytogenes</i> oder <i>Listeria spp.</i>	13
9.5.1 Auswahl von Kolonien für die Bestätigung	13
9.5.2 Bestätigung von <i>L. monocytogenes</i>	14
9.5.3 Bestätigung von <i>Listeria spp.</i>	18
9.6 Bewertung der morphologischen und physiologischen Eigenschaften und der biochemischen Reaktionen	19
9.7 Zusätzliche Charakterisierung isolierter Stämme (optional)	19
10 Angabe der Ergebnisse	19
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens	20
11.1 Untersuchungen zur Verfahrensvalidierung	20
11.2 Empfindlichkeit	20
11.3 Spezifität	20
11.4 Nachweisgrenze (LOD ₅₀)	20
12 Untersuchungsbericht	20

13	Qualitätssicherung.....	20
Anhang A (normativ)	Verfahrensschema	21
Anhang B (normativ)	Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien und Reagenzien	22
Anhang C (informativ)	Unterscheidung von <i>Listeria</i> spp. von anderen Gattungen	35
Anhang D (informativ)	Reaktionen zur Identifizierung von <i>Listeria</i> -Arten	36
Anhang E (informativ)	<i>Listeria</i> -Selektivagar	38
Anhang F (informativ)	Ergebnisse von Ringversuchen zum Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	39
Literaturhinweise.....		44

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 11290-1:2017) 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 Dezember 2017, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2017 zurückgezogen werden.

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

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 11290-1:1996.

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 11290-1:2017 wurde von CEN als EN ISO 11290-1:2017 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 zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen, sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

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

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 11290-1:1996), die technisch überarbeitet wurde. Sie beinhaltet auch die Änderung ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zu ISO 11290-1:1996 sind folgende:

- Der Nachweis von *Listeria monocytogenes* wurde wie unten aufgelistet geändert.
- Erste Anreicherung in Halb-Fraser-Bouillon: Bebrütung für 25 h ± 1 h.
- Zweite Anreicherung in Fraser-Bouillon: Bebrütung für 24 h ± 2 h [29].
- Die Halb-Fraser-Bouillon und die Fraser-Bouillon dürfen vor dem Subkultivieren oder der Isolierung auf dem Selektivagar für eine Höchstdauer von 72 h gekühlt gelagert werden.
- Lagerung der Agarplatten: Bebrütete Platten können vor der Ablesung für eine Höchstdauer von zwei Tagen gekühlt gelagert werden.

- Das mikroskopische Aussehen für die Bestätigung ist optional, wenn der Isolierungs-Agar eine Unterscheidung zwischen pathogenen und nicht pathogenen *Listeria* spp. ermöglicht.
- Der CAMP-Test und der Katalasetest sind optional.
- Einbeziehung neuer Leistungsmerkmale.
- Darüber hinaus wurde der Nachweis von *Listeria* spp. in den Anwendungsbereich einbezogen und der Titel wurde entsprechend geändert.

Eine Liste mit Teilen der ISO 11290-Serie steht auf der ISO-Webseite zur Verfügung.

Einleitung

Die wichtigsten im Vorwort angegebenen und in diesem Dokument im Vergleich zu ISO 11290-1:1996 eingeführten Änderungen werden als wesentlich betrachtet (siehe ISO 17468 [28]). Die technischen Änderungen wurden bewertet und es wurde festgestellt, dass sie keine bedeutenden Auswirkungen auf die Leistungsmerkmale oder Untersuchungsergebnisse des Verfahrens haben.

Aufgrund der großen Vielzahl an Lebens- und Futtermittelprodukten ist dieses horizontale Verfahren nicht unbedingt bis ins Detail für bestimmte Produkte geeignet, für manche kann die Anwendung abweichender oder spezifischerer Untersuchungsverfahren notwendig sein. Dennoch soll dem vorgegebenen Verfahren stets so weit wie möglich gefolgt werden und nur dann von ihm abgewichen werden, wenn es aus gerechtfertigten technischen Gründen unvermeidbar ist.

Bei der nächsten Überprüfung 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 der 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 zu hoffen, dass diese Normen bei einer Überarbeitung an dieses Dokument angepasst werden, sodass es sich bei den verbleibenden Abweichungen von diesem horizontalen Verfahren nur um solche mit gut etablierten technischen Gründen handelt.

WARNUNG — Um die Gesundheit des Laborpersonals sicherzustellen, ist es unerlässlich, dass Untersuchungen zum Nachweis von *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. 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 liegt in der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Gesundheitsschutzmaßnahmen zu treffen. Vor allem wird dringend empfohlen, die Untersuchungen zum Nachweis von *L. monocytogenes* in Laboratorien durchzuführen, in denen Bedingungen der biologischen Sicherheitsstufe 2 herrschen. Es wird dringend empfohlen, weibliches Laborpersonal darauf hinzuweisen, dass eine durch den Umgang mit *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. entstehende Infektion der Mutter ein besonderes Risiko für den sich entwickelnden Fötus darstellt, und dass schwangere Mitarbeiterinnen und Personen mit diagnostizierten Grunderkrankungen, die eine zellvermittelte Immunität beeinträchtigen, nicht mit Kulturen von *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. arbeiten.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein horizontales Verfahren fest für

- den Nachweis von *L. monocytogenes* und
- den Nachweis von *Listeria* spp. (einschließlich *L. monocytogenes*).

Dieses Dokument gilt für

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

Es ist möglich, dass bestimmte, zusätzlich beschriebene *Listeria*-Arten nicht unbedingt mit diesem Verfahren nachweisbar oder bestätigbar sind [5], [10], [12], [14], [25], [26], [27].

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden 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 Browser Plattform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

Listeria monocytogenes

Mikroorganismen, die typische Kolonien auf festen Selektivmedien bilden und bei Untersuchungen nach diesem Dokument die beschriebenen morphologischen, physiologischen und biochemischen Merkmale aufweisen

3.2

Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Ermittlung des Nachweises/Nichtnachweises von *Listeria monocytogenes* (3.1) in einer vorgegebenen Masse oder einem vorgegebenen Volumen eines Produktes oder einer vorgegebenen Fläche, wenn die Untersuchungen nach diesem Dokument durchgeführt werden

3.3

***Listeria* spp.**

Mikroorganismen, die typische Kolonien auf festen Selektivmedien bilden und bei Untersuchungen nach diesem Dokument die beschriebenen morphologischen, physiologischen und biochemischen Merkmale aufweisen

3.4

Nachweis von *Listeria* spp.

Ermittlung des Nachweises/Nichtnachweises von *Listeria* spp. (3.3) in einer vorgegebenen Masse oder einem vorgegebenen Volumen eines Produktes oder einer vorgegebenen Fläche, wenn die Untersuchungen nach diesem Dokument durchgeführt werden

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Listeria spp. können in geringer Zahl vorhanden sein und kommen häufig gemeinsam mit einer beträchtlich größeren Anzahl anderer Mikroorganismen vor; deshalb ist eine selektive Anreicherung erforderlich. Es ist außerdem notwendig, geschädigte und gestresste *Listeria* spp. nachzuweisen; das erste selektive Anreicherungsmedium mit verminderter Hemmstoffkonzentration leistet dies zumindest teilweise.

ANMERKUNG Die Anwesenheit von *L. monocytogenes* kann durch die Anwesenheit anderer *Listeria*-Arten, vor allem *L. innocua* oder *L. ivanovii*, maskiert werden.

Im Rahmen dieses Dokuments sind für den Nachweis von *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. vier aufeinanderfolgende Schritte erforderlich, wie im Ablaufschema in Anhang A beschrieben.

4.2 Erste Anreicherung in einem selektiven flüssigen Anreicherungsmedium mit verminderten Konzentrationen an selektiven Agenzien (Halb-Fraser-Bouillon)

Ein erstes selektives Anreicherungsmedium, das die Hälfte der Konzentration an Acriflavin und Nalidixinsäure enthält (Halb-Fraser-Bouillon, siehe B.1) und das auch als Verdünnungsflüssigkeit für die Prüfmenge (9.1) verwendet wird, wird beimpft.

Diese Erstverdünnung wird 24 h bis 26 h bei 30 °C bebrütet.

4.3 Zweite Anreicherung in einem selektiven flüssigen Anreicherungsmedium mit vollständigen Konzentrationen an selektiven Agenzien (Fraser-Bouillon)

Ein zweites vollständiges selektives Anreicherungsmediums (Fraser-Bouillon) wird mit einer Kultur aus 4.2 beimpft.

Die Fraser-Bouillon wird 24 h bei 37 °C bebrütet [29].

4.4 Ausplattierung und Identifizierung

Mit den nach 4.2 und 4.3 erhaltenen Kulturen erfolgt das Ausplattieren auf zwei festen Selektivmedien:

- Listerien-Agar nach Ottaviani und Agosti (siehe Literaturhinweise [16] und [17] und B.3);
- ein beliebiges anderes festes Selektivmedium nach Wahl des Labors zur Ergänzung des Listerien-Agars nach Ottaviani und Agosti, mit einem anderen Substrat und/oder Prinzip als bei Listerien-Agar nach Ottaviani und Agosti (siehe B.4). Informationen zu den Medien sind in Anhang E enthalten.

Der Listerien-Agar nach Ottaviani und Agosti wird bei 37 °C für insgesamt 48 h bebrütet. Wenn Kolonien von präsumtiven *L. monocytogenes* oder *Listeria* spp. nach 24 h erkennbar sind, darf die Bebrütung zu diesem Zeitpunkt beendet werden. Das zweite Selektivmedium wird bei einer geeigneten Temperatur bebrütet und nach einer geeigneten Zeitdauer untersucht.

4.5 Bestätigung

Kolonien von präsumtiven *L. monocytogenes* oder *Listeria* spp., die wie in 4.4 beschrieben ausplattiert wurden, werden subkultiviert und mit geeigneten morphologischen und/oder biochemischen Untersuchungen bestätigt.

5 Nährmedien und Reagenzien

Zur üblichen Laborpraxis wird auf ISO 11133 verwiesen.

Zusammensetzung und Leistungsprüfung von Nährmedien und Reagenzien sowie deren Herstellung sind in Anhang B beschrieben.

6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

Übliche Geräte eines mikrobiologischen Labors (wie in ISO 7218 festgelegt) und insbesondere die folgenden Geräte.

6.1 Gerät für die Trockensterilisation (Heißluft-Sterilisator) oder Dampfsterilisation (Autoklav).

Wie in ISO 7218 festgelegt.

6.2 Trocken- oder Brutschrank, auf einen Bereich zwischen 25 °C und 50 °C einstellbar.

- 6.3 Brutschränke**, auf $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (optional) einstellbar.
- 6.4 Wasserbad**, auf 47 °C bis 50 °C einstellbar.
- 6.5 Sterile Impfösen**, mit einem Durchmesser von etwa 3 mm oder 10 µl Volumen, sowie **Impfnadel** oder **Impfdraht**.
- 6.6 pH-Messgerät**, mit einer Ablesegenauigkeit von 0,01 pH-Einheiten bei 25 °C und einer Fehlergrenze von $\pm 0,1$ pH-Einheiten.
- 6.7 Messpipetten oder automatische Pipetten**, mit 1 ml und 10 ml Nennvolumen.
- 6.8 Petrischalen**, zum Beispiel mit einem Durchmesser von 90 mm.
- 6.9 Mikroskop**, vorzugsweise Phasenkontrastmikroskop, mit Objektträgern und Deckgläsern.
- 6.10 Kühlschrank**, der bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ betrieben werden kann.

7 Probenahme

Die Probenahme ist kein Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Liegt keine spezifische Internationale Norm zur Probennahme des betreffenden Produktes vor, wird den Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen. Für Lebens- und Futtermittelproben wird auf ISO/TS 17728 [3] verwiesen. Bei Umgebungsproben wird ISO 18593 [2] angewendet, siehe auch Literaturhinweis [24].

Es ist wichtig, dass das Labor eine Probe erhält, die tatsächlich repräsentativ ist und während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde (siehe ISO 7218).

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird nach der spezifischen Internationalen Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, vorbereitet [siehe ISO 6887 (alle Teile) und ISO 18593 [2]]. Liegt keine spezifische Internationale Norm vor, wird den Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

9 Durchführung

9.1 Prüfmenge und Erstverdünnung

Es wird auf ISO 6887 (alle Teile) und jede geeignete Internationale Norm für das betreffende Produkt verwiesen.

Für die Herstellung der Erstverdünnung wird als Verdünnungsflüssigkeit das in B.1 festgelegte erste selektive Anreicherungsmedium (Halb-Fraser-Bouillon) verwendet.

Im Allgemeinen wird zur Herstellung der Erstverdünnung eine Prüfmenge von 25 g oder 25 ml zu 225 g oder 225 ml des ersten selektiven Anreicherungsmediums (B.1) gegeben, um eine zehnfache Verdünnung zu erhalten, und homogenisiert. Vor dem Gebrauch wird das erste selektive Anreicherungsmedium auf Raumtemperatur vorgewärmt.

Dieses Dokument wurde für Prüfmengen von 25 g oder ml validiert. Eine kleinere Prüfmenge darf ohne die Notwendigkeit einer zusätzlichen Validierung/Verifizierung verwendet werden, vorausgesetzt, dass zwischen erster Anreicherungsbouillon und der Prüfmenge dasselbe Verhältnis beibehalten wird. Eine größere Prüfmenge als die ursprünglich validierte darf verwendet werden, wenn in einer