

DIN EN ISO 19250



ICS 07.100.20

**Wasserbeschaffenheit –
Bestimmung von *Salmonella* spp. (ISO 19250:2010);
Deutsche Fassung EN ISO 19250:2013**

Water quality –
Detection of *Salmonella* spp. (ISO 19250:2010);
German version EN ISO 19250:2013

Qualité de l'eau –
Recherche de *Salmonella* spp. (ISO 19250:2010);
Version allemande EN ISO 19250:2013

Gesamtumfang 31 Seiten

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 19250:2010 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 19250:2013 durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Unterausschuss NA 119-01-03-03 UA „Mikrobiologie“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Bezeichnung des Verfahrens:

Bestimmung von *Salmonella* spp. (K 18):

Verfahren DIN EN ISO 19250 — K 18

Für die Anwendung in Deutschland wird folgender Hinweis gegeben:

In 8.3, 1. Absatz wurde das in der ISO-Fassung angegebene zu überführende Volumen der nach 8.2 erhaltenen Kultur auf **0,1 ml** korrigiert.

In 8.5.3.3 wurde gegenüber der ISO-Fassung für die Inkubationszeiten die Grenzabweichung von **3 h** angegeben.

In B.9.3 wurde die Angabe der üblichen Kühlschranktemperaturen zur Lagerung der Novobiocin-Lösung auf **(5 ± 3) °C** gegenüber der ISO-Fassung korrigiert.

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

ISO 3696	siehe	DIN ISO 3696
ISO 6579	siehe	DIN EN ISO 6579
ISO 6887-1	siehe	DIN EN ISO 6887-1
ISO 7218	siehe	DIN EN ISO 7218
ISO 8199	siehe	DIN EN ISO 8199
ISO 19458	siehe	DIN EN ISO 19458
ISO/TS 11133-1	siehe	DIN ISO/TS 11133-1
ISO/TS 11133-2	siehe	DIN CEN ISO/TS 11133-2 (DIN SPEC 10126)
ISO/TR 13843	siehe	DIN V ENV ISO 13843

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die vorliegende Norm enthält das vom Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN und von der Wasserchemischen Gesellschaft – eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker – gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Bestimmung von *Salmonella* spp. (K 18).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „*Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Telefon 030 2601–2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 6579, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonella spp.*

DIN EN ISO 6887-1, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen*

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

DIN EN ISO 8199, *Wasserbeschaffenheit — Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch Kulturverfahren*

DIN EN ISO 19458, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme für mikrobiologische Untersuchungen*

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

DIN ISO/TS 11133-1, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Anleitungen für die Vorbereitung und Herstellung von Nährmedien — Teil 1: Allgemeine Anleitungen für die Qualitätssicherung bei der Zubereitung von Nährmedien im Laboratorium*

DIN CEN ISO/TS 11133-2 (DIN SPEC 10126), *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Anleitung für die Vorbereitung und Herstellung von Nährmedien — Teil 2: Praktische Anleitung zur Leistungsprüfung von Nährmedien*

DIN V ENV ISO 13843, *Wasserbeschaffenheit — Richtlinie zur Validierung mikrobiologischer Verfahren (ISO/TR 13843)*

Deutsche Fassung

Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von *Salmonella* spp. (ISO 19250:2010)

Water quality - Detection of *Salmonella* spp. (ISO 19250:2010)

Qualité de l'eau - Recherche de *Salmonella* spp. (ISO 19250:2010)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 21. März 2013 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 des CEN-CENELEC 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, 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

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

Inhalt

Seite

Vorwort.....	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen.....	5
3 Begriffe	6
4 Grundlage des Verfahrens.....	6
4.1 Allgemeines.....	6
4.2 Voranreicherung in nicht-selektivem Flüssigmedium.....	6
4.3 Anreicherung in selektivem Flüssigmedium	6
4.4 Ausplattierung und Erkennung	7
4.5 Bestätigung	7
5 Geräte	7
6 Probenahme	8
7 Kulturmedien und Reagenzien	8
8 Durchführung	8
8.1 Probenvorbereitung	8
8.2 Nicht-selektive Voranreicherung	9
8.3 Selektive Anreicherung.....	9
8.4 Ausplattieren	10
8.5 Bestätigung	10
9 Angabe der Ergebnisse	13
10 Untersuchungsbericht	13
11 Qualitätssicherung.....	13
Anhang A (normativ) Diagramm der Vorgehensweise	14
Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Zubereitung von Kulturmedien und Reagenzien	15
B.1 Gepuffertes Peptonwasser (BPW).....	15
B.2 Rappaport-Vassiliadis-Bouillon mit Soja (RVS).....	15
B.3 Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar).....	17
B.4 Nähragar	17
B.5 Drei-Zucker-Eisen-Agar (TSI-Agar).....	18
B.6 Harnstoff-Agar (Christensen)	18
B.7 L-Lysin-Decarboxylierungsmedium	19
B.8 Selenit-Cystin-Bouillon	19
B.9 Muller-Kauffmann-Tetrathionat-Novobiocin-Bouillon (MKTTn)	20
B.10 Filtrierhilfsmittel.....	21
Anhang C (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	22
C.1 Einleitung	22
C.2 Verteilung der Zellen in den Proben und Teilproben.....	22
Literaturhinweise	27

Vorwort

Der Text von ISO 19250:2010 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 19250:2013 durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, 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 Oktober 2013, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2013 zurückgezogen werden.

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

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, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 19250:2010 wurde vom CEN als EN ISO 19250:2013 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Einleitung

Salmonella spp. sind Bakterien, die weltweit weit verbreitet sind. Sie werden üblicherweise als Krankheitserreger eingeordnet, obwohl ihre Virulenz und Pathogenität stark variiert. Zu den natürlichen Wirten von *Salmonella* spp. gehören Menschen, landwirtschaftliche Nutztiere und Haustiere sowie wild lebende Tiere, einschließlich Vögel. Menschen und Tiere können diese Bakterien entweder als asymptomatische Träger oder während einer Krankheit ausscheiden. Es ist daher unmöglich, sie aus der Umwelt zu eliminieren. Nach einer Infektion von Menschen kann die Übertragung von *Salmonella* spp. schwere Krankheiten zur Folge haben.

Da Wasser einer dieser Übertragungswege ist, wird die An- oder Abwesenheit von *Salmonella* im Wasser überwacht, wenn ein Infektionsrisiko bemerkt wurde. *Salmonella* können in allen Arten häuslichen oder landwirtschaftlichen Abwassers, Süßwasser einschließlich Grund- und Trinkwasser sowie Meerwasser vorkommen.

Der Nachweis von *Salmonella* spp. in Wasser erfordert üblicherweise einen Konzentrierungsschritt. Da Zellen von *Salmonella* spp. in wässriger Umgebung geschädigt werden können, benötigt man für ihren Nachweis in Wasser üblicherweise einen Voranreicherungsschritt.

WARNUNG — Um die Gesundheit des Laborpersonals nicht zu gefährden, ist es unbedingt erforderlich, dass Untersuchungen zum Nachweis von *Salmonella* und besonders *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi (*Salmonella* ser. Typhi) und *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Paratyphi (*Salmonella* ser. Paratyphi) nur in entsprechend ausgerüsteten Laboratorien unter der Verantwortung eines ausgebildeten Mikrobiologen durchgeführt werden, und dass das gesamte bebrütete Material höchst sorgfältig entsorgt wird.

Anwender dieser Internationalen Norm sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Norm gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitgebers, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen, dass diese mit nationalen Festlegungen übereinstimmen.

WICHTIG — Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Internationalen Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. (präsumtiv oder bestätigt) in Wasserproben fest. Es ist möglich, dass bei besonderen epidemiologischen Situationen oder bei Untersuchungen von Krankheitsausbrüchen auch andere Medien benötigt werden.

WARNUNG — Es ist möglich, dass das Verfahren nicht alle *Salmonella* ser. Typhi und ser. Paratyphi erfasst.

ANMERKUNG Für eine semi-quantitative Untersuchung können MPN-Ansätze (en: most probable number – wahrscheinlichste Zahl) unter Verwendung geeigneter Probenvolumen durchgeführt werden. Für diese Fälle wird das Volumen des gepufferten Peptonwassers entsprechend angepasst.

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 aller Änderungen).

ISO 6579, *Microbiology of food and animal feeding stuff — Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*

ISO 6887-1, *Microbiology of food and animal feeding stuff — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*

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

ISO 7704, *Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses*

ISO 8199, *Water quality - General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture*

ISO 19458, *Water quality — Sampling for microbiological analysis*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

präsumtive *Salmonella* spp.

Bakterien, die im selektiven Anreicherungsmedium wachsen und die typische oder atypische Kolonien auf dem Selektivmedium bilden

3.2

bestätigte *Salmonella* spp.

Bakterien, die im selektiven Anreicherungsmedium wachsen, typische und verdächtige Kolonien auf dem festen Selektivmedium bilden und die spezifische biochemische und serologische Eigenschaften zeigen

ANMERKUNG Die spezifischen biochemischen und serologischen Eigenschaften werden durch die in dieser Internationalen Norm beschriebenen Tests bestimmt.

3.3

Nachweis von *Salmonella* spp.

Feststellung der An- oder Abwesenheit von *Salmonella* spp. (3.4)

3.4

***Salmonella* spp.**

Salmonella

Bakterien, die typische oder atypische Kolonien auf festem Selektivmedium bilden und die spezifische biochemische und serologische Eigenschaften zeigen

4 Grundlage des Verfahrens

4.1 Allgemeines

Für den Nachweis von *Salmonella* spp. sind vier aufeinanderfolgende Schritte erforderlich (siehe auch Anhang A).

Oft ist eine Voranreicherung erforderlich, um eine geringe Anzahl an Salmonellen oder geschädigte Salmonellen nachzuweisen. Einige Salmonellen und solche, die subletal geschädigt sind, können eine zusätzliche Bebrütungszeit erfordern. Darüber hinaus können Salmonellen in geringer Anzahl anwesend sein und oft von bedeutend größeren Anzahlen anderer Mitglieder der *Enterobacteriaceae* oder von anderen Bakterien begleitet werden. Daher ist eine selektive Anreicherung notwendig.

4.2 Voranreicherung in nicht-selektivem Flüssigmedium

Gepuffertes Peptonwasser (B.1) wird bei Raumtemperatur mit einem bekannten Volumen der Probe oder ihrer Verdünnungen angeimpft und bei $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ für (18 ± 2) h bebrütet. Größere Volumina können mittels Membranfiltration konzentriert werden, und der Filter wird dann zu dem gepufferten Peptonwasser gegeben.

ANMERKUNG Für Abwasser wurde gezeigt, dass kürzere Inkubationszeiten oder direktes Einimpfen der Probe in selektives Medium (4.3) bessere Ergebnisse ergibt.

Für eine semi-quantitative Untersuchung können MPN-Ansätze (en: most probable number – wahrscheinlichste Zahl) unter Verwendung geeigneter Probenvolumen durchgeführt werden. Das Volumen des gepufferten Peptonwassers ist entsprechend anzupassen.

4.3 Anreicherung in selektivem Flüssigmedium

Rappaport-Vassiliadis-Bouillon mit Soja (RVS-Bouillon) und Muller-Kauffmann Tetrathionat-Novobiocin-Bouillon (MKTn) werden mit der Kultur, die in 4.2 erhalten wurde, angeimpft.

Die RVS-Bouillon wird bei $(41,5 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ für (24 ± 3) h und die MKTn-Bouillon bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ für (24 ± 3) h bebrütet.