

DIN EN ISO 21567



ICS 07.100.30

**Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln –
Horizontales Verfahren für den Nachweis von *Shigella* spp.
(ISO 21567:2004);
Deutsche Fassung EN ISO 21567:2004**

Microbiology of food and animal feeding stuffs –
Horizontal method for the detection of *Shigella* spp. (ISO 21567:2004);
German version EN ISO 21567:2004

Microbiologie des aliments –
Méthode horizontale pour la recherche de *Shigella* spp. (ISO 21567:2004);
Version allemande EN ISO 21567:2004

Gesamtumfang 32 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Die Europäische Norm EN ISO 21567:2004 enthält unverändert die Internationale Norm ISO 21567, 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 21567:2004 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
ISO/TS 11133-2	siehe DIN ISO/TS 11133-2

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*

DIN ISO/TS 11133-2, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Anleitung für die Vorbereitung und Herstellung von Nährmedien — Teil 2: Praktische Anleitung zur Leistungsprüfung von Nährmedien (ISO/TS 11133-2:2003); Deutsche Fassung CEN ISO/TS 11133-2:2004*

Deutsche Fassung

**Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln
Horizontales Verfahren für den Nachweis von *Shigella* spp.
(ISO 21567:2004)**

Microbiology of food and animal feeding stuffs —
Horizontal method for the detection of *Shigella* spp.
(ISO 21567:2004)

Microbiologie des aliments —
Méthode horizontale pour la recherche de *Shigella* spp.
(ISO 21567:2004)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 20. Oktober 2004 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, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Nährmedien, Chemikalien und Antiseren	6
6 Geräte und Glasgeräte	6
7 Probenahme	7
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	7
9 Durchführung	7
10 Angabe der Ergebnisse	15
11 Untersuchungsbericht	15
Anhang A (normativ) Fließschema der Untersuchung	16
Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien und Chemikalien	17
Anhang C (normativ) Beschreibung von Morphologie und Farbe von <i>Shigella</i>-Kolonien auf Selektivagarmedien zur Identifizierung und Qualitätskontrolle	30

Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 21567:2004) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Lebensmittelerzeugnisse“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ 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 Mai 2005, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2005 zurückgezogen werden.

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 21567:2004 wurde vom CEN als EN ISO 21567:2004 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Einleitung

Wegen der Vielfalt von Produkten innerhalb eines Anwendungsbereiches 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 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 jedoch anzustreben, sie bei einer Überarbeitung an diese Internationale Norm anzupassen, so dass es sich bei den noch verbleibenden Abweichungen nur um solche handelt, die fachlich begründet sind.

WARNUNG — Um die Gesundheit des Laborpersonals zu schützen, ist es von wesentlicher Bedeutung, dass das gesamte Verfahren durch ausgebildetes Personal durchgeführt wird, das die Gute Laborpraxis anwendet und vorzugsweise in einem abgegrenzten Bereich arbeitet. Die einschlägigen nationalen Bestimmungen über Gesundheit und Sicherheit, die für diesen Mikroorganismus zutreffen, müssen eingehalten werden. Bei der Entsorgung allen infektiösen Materials ist sorgfältig vorzugehen.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein horizontales Verfahren für den Nachweis von *Shigella*-Spezies fest.

Vorbehaltlich der in der Einleitung angeführten Einschränkungen gilt diese Internationale Norm für

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

2 Normative Verweisungen

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

ISO 6887-1, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — 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 6887-2, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products*

ISO 6887-3, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 3: Specific rules for the preparation of meat and meat products*

ISO 6887-4, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products, meat and meat products, and fish and fishery products*

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

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*

ISO/TS 11133-2, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Shigella

Mikroorganismen, die für diese Spezies typische Kolonien auf festen Selektivmedien bilden und bei Untersuchung nach dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren die beschriebenen biochemischen und serologischen Eigenschaften besitzen

3.2

Nachweis von *Shigella* spp.

Feststellung der Anwesenheit oder Abwesenheit dieser Mikroorganismen in einer vorgegebenen Produktmenge bei der Untersuchung nach dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Der Nachweis von *Shigella* erfordert vier aufeinander folgende Schritte (siehe Anhang A).

4.2 Voranreicherung in einem selektiven flüssigen Nährmedium

Die Einwaage wird zu *Shigella*-Bouillon, die 0,5 µg/ml Novobiocin enthält, zugesetzt. Anschließend wird unter anaeroben Bedingungen für 16 h bis 20 h bei 41,5 °C ± 1 °C bebrütet.

4.3 Ausstreichen zur Isolierung und Erkennung der Kolonien

Aus der erhaltenen Anreicherungskultur werden drei selektive Differentialnährmedien beimpft: MacConkey-Agar mit niedriger Selektivität, XLD-Agar mit mäßiger Selektivität und Hektoen-Agar (Hektoen enteric agar) mit der höheren Selektivität. Die Bebrütung dieser Selektivagarmedien erfolgt für 20 h bis 24 h bei 37 °C.

4.4 Biochemische und serologische Bestätigung

Von jedem der drei Selektivagarmedien werden typische und verdächtige Kolonien ausgewählt und auf Nähragar Reinkulturen angelegt.

Es folgt die biochemische und serologische Charakterisierung mit Hilfe der beschriebenen Untersuchungen.

5 Nährmedien, Chemikalien und Antiseren

Zur üblichen Laborpraxis siehe ISO 7218. Für die Vorbereitung, Herstellung und Leistungsprüfung von Nährmedien siehe ISO/TS 11133-1 und ISO/TS 11133-2.

Falls nicht anders festgelegt, sind nur anerkannt analysenreine Reagenzien und destilliertes oder entmineralisiertes Wasser oder Wasser gleichwertiger Reinheit zu verwenden.

Die zu verwendenden Medien, Reagenzien und Antiseren werden in Anhang B beschrieben.

In der Regel erbringen kommerziell erhältliche Trockennährböden beständigere Ergebnisse als die im Labor aus ihren Bestandteilen hergestellten. Bei ihrer Anwendung ist den Anweisungen des Herstellers zu folgen, weil kleine Veränderungen bei der Herstellung die Leistung der Selektivmedien stark verändern können. Übermäßiges Erwärmen der in dieser Norm verwendeten Selektivagarböden durch Autoklavieren, Lagerung und erneutes Erwärmen für die Verwendung kann zum Verlust der Selektivität führen.

6 Geräte und Glasgeräte

Einweggeräte mit geeigneten Kennwerten sind eine zulässige Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

Übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Labors (siehe ISO 7218) und insbesondere die folgenden Geräte:

6.1 Gerät für die Trockensterilisation (Wärmeschränk) oder Dampfsterilisation (Autoklav) der Ausrüstung

Siehe ISO 7218.

6.2 Trocknungskammer oder Wärmeschränk, Wärmeübertragung durch Umluft, auf Betriebstemperaturen zwischen 37 °C und 55 °C einstellbar.

6.3 Brutschränke, einstellbar auf 37 °C ± 1 °C und 41,5 °C ± 1 °C.

6.4 Anaerobiertöpfe oder anaerob arbeitende Brutkammern und die dazu gehörigen Geräte zur Erreichung anaerober Bedingungen mit einer Gaszusammensetzung von < 1 % O₂ und 9 % CO₂ bis 13 % CO₂. Siehe ISO 7218.

6.5 Wasserbäder, auf $47\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ einstellbar zum Abkühlen der verflüssigten Medien vor dem Plattenguss sowie ein weiteres, einstellbar auf $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (siehe B.6.3.2 und B.10.2.2).

6.6 Beutelwalkmischer (Stomacher) oder **Labormischer**.

Siehe ISO 7218.

6.7 Impfnadeln und **-ösen** aus Platin/Iridium oder Nickel/Chrom, Impfösen von etwa 3 mm Durchmesser oder Impfösen und -nadeln aus Kunststoff zum Einmalgebrauch mit geeigneten Spezifikationen.

6.8 pH-Messgerät, kalibriert auf $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei 25 °C .

6.9 Kolben und **Flaschen** mit Verschluss, mit geeignetem Volumen für die Verwendung bei der Herstellung und Lagerung der Anreicherungsbouillons und der Agarmedien.

6.10 Messzylinder.

6.11 Kulturröhrchen, 18 mm Durchmesser und 160 mm Länge (mit Stopfen oder Schraubverschluss), oder **Kulturflaschen**, Nennvolumen 30 ml und 10 ml, mit ausgekleideten nicht toxischen Metallverschlüssen oder Einmalverschlüssen aus Kunststoff.

6.12 Petrischalen, Durchmesser von 90 mm bis 100 mm und 140 mm.

6.13 Objektträger oder **Platten aus Glas**, geeignet für Agglutinationsprüfungen.

7 Probenahme

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

Die Probenahme wird in dieser Internationalen Norm nicht festgelegt. Dazu ist die spezifische Internationale Norm heranzuziehen, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst. Liegt keine entsprechende Internationale Norm vor, wird den beteiligten Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Probe ist nach den relevanten Teilen der ISO 6887 und/oder nach ISO 8261 vorzubereiten.

Die Untersuchung der Proben sollte so schnell wie möglich begonnen werden, da *Shigella* eine geringe Überlebensfähigkeit hat.

9 Durchführung

(Siehe das Fließschema in Anhang A).

9.1 Einwaage

Siehe die relevanten Teile von ISO 6887 und/oder ISO 8261, in denen die Vorgehensweisen für die entsprechenden Produkte behandelt werden.

9.2 Anreicherung

Im Allgemeinen werden x g oder x ml der Einwaage zu $9x$ ml *Shigella*-Bouillon mit $0,5\text{ µg/ml}$ Novobiocin (B.1.2) zugesetzt, um eine Verdünnung der Untersuchungsprobe von 1:10 herzustellen. Die Einwaage wird in der Bouillon mit einem Beutelwalkmischer oder Labormischer (6.6) homogenisiert. Falls erforderlich, wird der pH-Wert unter aseptischen Bedingungen auf $7,0 \pm 0,2$ eingestellt.

Die *Shigella*-Bouillon wird unter anaeroben Bedingungen in einem Gerät (6.4) mit locker sitzenden Verschlüssen, so dass der Gasaustausch leicht und ohne Kontamination stattfinden kann, oder in einem Gerät mit gleichwertiger Wirkung, bebrütet. Die Bebrütung erfolgt 16 h bis 20 h bei $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (6.3).

9.3 Ausstreichen und Kolonieauswahl

9.3.1 Die Bouillon mit den nach 9.2 erhaltenen Kulturen wird vorsichtig von Hand durchmischt und das Absetzen der größeren Teilchen abgewartet.

Mittels einer Öse (6.7) werden die Oberflächen von den folgenden drei Selektivagarmedien so beimpft, dass gut voneinander getrennte Kolonien entstehen: MacConkey-Agar (B.2.1) mit niedriger Selektivität; XLD-Agar (B.2.2) mit mäßiger Selektivität und Hektoen-Agar (B.2.3) mit höchster Selektivität.

9.3.2 Die Platten werden zwischen 20 h und 24 h bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ bebrütet (6.3).

9.3.3 Das Aussehen unterschiedlicher *Shigella*-Spezies kann auf dem gleichen Selektivagar variieren. Zur Beschreibung von *Shigella*-Kolonien auf den unterschiedlichen verwendeten Selektivagarmedien siehe Anhang C.

Shigella-Spezies können bei der Kontamination einer Lebensmittelprobe oder nach der Voranreicherung im Verhältnis zur gesamten Keimflora in der Minderheit sein. Dann kann der Nachweis von *Shigella*-Kolonien nach direktem Ausstrich der Voranreicherungsbouillon auf eine Platte je Selektivagarmedien misslingen. Es kann deshalb unter gewissen Umständen (z. B. bei der Untersuchung von Lebensmitteln im Rahmen eines Krankheitsausbruchs) geeignet sein, zwei 90-mm-Petrischalen oder eine große Petrischale (140 mm) (6.12) zu beimpfen, um die Nachweismöglichkeiten zu erhöhen.

Die Kolonien einiger Enterobacteriaceae-Stämme sind denen von *Shigella* im Aussehen sehr ähnlich. Alle typischen oder verdächtigen Kolonien müssen nach 9.4 untersucht und als *Shigella*-Spezies entweder bestätigt oder nicht bestätigt werden. Auch kann es unter bestimmten Umständen (z. B. bei der Untersuchung von Lebensmitteln im Rahmen einer Lebensmittelinfektion) geeignet sein, mehr als fünf Kolonien von einer Platte zu untersuchen, um die Sicherheit der Abwesenheit von *Shigella* in der untersuchten Lebensmittelprobe zu erhöhen.

Die typischen oder verdächtigen Kolonien auf den Platten werden markiert.

Wenn keine typischen Kolonien zu finden sind und das Wachstum anderer Mikroorganismen schwach ist (besonders auf den selektiveren Agarmedien), werden die Platten erneut für 24 h bebrütet. Es wird erneut auf *Shigella*-verdächtige Kolonien untersucht.

Es ist die Bestätigung nach 9.4 durchzuführen.

9.4 Bestätigung der Kolonien

9.4.1 Allgemeines

Kommerziell erhältliche Identifizierungskits dürfen verwendet werden, wenn vom Anwender nachgewiesen wurde, dass sie für die Identifizierung der unterschiedlichen Spezies von *Shigella* geeignet sind. Die Anweisungen des Herstellers sind zu befolgen.

Zur Bestätigung der Subkultur werden von jeder Platte jedes Selektivmediums (siehe 9.3) fünf markierte typische oder verdächtige Kolonien entnommen.

Falls auf einer Platte weniger als fünf typische oder verdächtige Kolonien vorhanden sind, werden alle markierten Kolonien zur Bestätigung entnommen.

Für die biochemische und serologische Bestätigung sind Reinkulturen zu verwenden.

9.4.2 Anlegen der Reinkulturen

Die ausgewählten Kolonien werden auf der Oberfläche von Nähragarplatten (B.3) so ausgestrichen, dass sich gut voneinander getrennte Kolonien entwickeln können.

Die beimpften Platten werden 18 h bis 24 h bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ bebrütet (6.3).