

DIN EN ISO 21872-1



ICS 07.100.30

Ersatz für
DIN EN ISO 21872-1:2017-10

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Horizontales Verfahren zur Bestimmung von *Vibrio* spp. –
Teil 1: Nachweis von potentiell enteropathogenen *Vibrio*
parahaemolyticus, *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus*
(ISO 21872-1:2017 + Amd 1:2023);
Deutsche Fassung EN ISO 21872-1:2017 + A1:2023**

Microbiology of the food chain –

Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. –Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*
and *Vibrio vulnificus* (ISO 21872-1:2017 + Amd 1:2023);

German version EN ISO 21872-1:2017 + A1:2023

Microbiologie de la chaîne alimentaire –

Méthode horizontale pour la détermination des *Vibrio* spp. –Partie 1: Recherche des espèces de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio*
vulnificus potentiellement entéropathogènes (ISO 21872-1:2017 + Amd 1:2023);

Version allemande EN ISO 21872-1:2017 + A1:2023

Gesamtumfang 54 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument enthält die Europäische Norm EN ISO 21872-1:2017, erarbeitet vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalyse — Horizontale Verfahren“, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird, sowie deren Änderung 1 (EN ISO 21872-1/A1:2023), erarbeitet vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird, und angenommen von CEN am 2022-12-24.

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

Der Beginn und das Ende von neuem oder geändertem Text werden durch die Markierungen **A1** **A1** angezeigt.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

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

ISO 5725-1	siehe	DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe	DIN ISO 5725-2
ISO 6887-1:2017	siehe	DIN EN ISO 6887-1:2017-07
ISO 6887-3	siehe	DIN EN ISO 6887-3
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 17468	siehe	DIN EN ISO 17468
ISO 22118	siehe	DIN EN ISO 22118
ISO 22119	siehe	DIN EN ISO 22119
ISO 22174	siehe	DIN EN ISO 22174

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 21872-1:2017-10 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Abschnitt 5 wurde modifiziert;
- b) In Unterabschnitt 5.2.1 wurden der zweite Satz und Tabelle 1 gestrichen;
- c) Anhang B wurde um Abschnitt B.12 „Leistungsprüfung“ ergänzt;
- d) Literaturhinweis [16], Literaturhinweis [17] und Literaturhinweis [18] wurden gestrichen und die folgenden Literaturhinweise wurden entsprechend umnummeriert.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 21872-1: 2017-10

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 6887-1:2017-07, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen* (ISO 6887-1:2017); Deutsche Fassung EN ISO 6887-1:2017

DIN EN ISO 6887-3, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 3: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Fisch und Fischerzeugnissen*

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 — Validierung*

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

DIN EN ISO 22118, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Leistungsmerkmale*

DIN EN ISO 22119, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe*

DIN EN ISO 22174, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe*

DIN ISO 5725-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

– Leerseite –

Deutsche Fassung

Mikrobiologie der Lebensmittelkette —
Horizontales Verfahren zur Bestimmung von *Vibrio* spp. —
Teil 1: Nachweis von potentiell enteropathogenen *Vibrio*
parahaemolyticus, *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus*
(ISO 21872-1:2017 + Amd 1:2023)

Microbiology of the food chain —
Horizontal method for the determination
of *Vibrio* spp. —

Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio*
parahaemolyticus, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*
(ISO 21872-1:2017 + Amd 1:2023)

Microbiologie de la chaîne alimentaire —
Méthode horizontale pour la détermination
des *Vibrio* spp. —

Partie 1: Recherche des espèces de *Vibrio*
parahaemolyticus, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus*
potentiellement entéropathogènes
(ISO 21872-1:2017 + Amd 1:2023)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 14. Mai 2017 angenommen. Die Änderung A1 modifiziert die Europäische Norm EN ISO 21872-1:2017. Sie wurde vom CEN am 24. Dezember 2022 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	5
A1 Europäisches Vorwort der Änderung 1	6
Vorwort	7
A1 Vorwort der Änderung 1	8
Einleitung	9
1 Anwendungsbereich	10
2 Normative Verweisungen	10
3 Begriffe	11
4 Kurzbeschreibung	11
4.1 Allgemeines	11
4.2 Primäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium	11
4.3 Sekundäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium	12
4.4 Isolierung und Identifizierung	12
4.5 Bestätigung	12
5 Nährmedien und Reagenzien	13
5.1 Anreicherungsmedium: alkalisches Peptonwasser (APW)	13
5.2 Festes selektives Isolierungsmedium	13
5.2.1 Erstes Medium: Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar-Medium	13
5.2.2 Zweites Medium	13
5.3 Kochsalz-Nähragar (SNA, en: Saline nutrient agar)	13
5.4 Reagenz für den Nachweis von Oxidase	13
5.5 Biochemische Untersuchungen	13
5.5.1 L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC)	13
5.5.2 Arginin-Dihydrolase-Salzmedium (ADH)	13
5.5.3 Reagenz für den Nachweis von β -Galactosidase	13
5.5.4 Salzmedium für den Nachweis von Indol	13
5.5.5 Salzhaltige Peptonwasser	13
5.5.6 Natriumchloridlösung	14
5.6 PCR	14
5.6.1 Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (oder ein Puffer mit für den Zweck vergleichbarer Leistung)	14
5.6.2 Mastermix	14
5.6.3 Primer und Sonden	14
5.6.4 Positives Kontrollmaterial	14
5.6.5 Negative Extraktionskontrolle	14
6 Geräte und Verbrauchsmaterialien	15
7 Probenahme	15
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	15
9 Durchführung (siehe Bild A.1)	15
9.1 Prüfmenge und Erstverdünnung	15
9.2 Primäre selektive Anreicherung	16
9.3 Sekundäre selektive Anreicherung	16
9.4 Isolierung und Identifizierung	17
9.5 Bestätigung	18
9.5.1 Allgemeines	18
9.5.2 Auswahl der Kolonien für die Bestätigung und Herstellung von Reinkulturen	18
9.5.3 Untersuchungen zur präsumtiven Identifizierung	19
9.5.4 Biochemische Bestätigung	19
9.5.5 PCR-Bestätigung	21
9.5.6 DNA-Extraktion	22
9.5.7 Konventionelle PCR	22

9.5.8	Real-Time-PCR	23
10	Angabe der Ergebnisse	23
11	Leistungsmerkmale des Verfahrens	23
11.1	Ringversuch	23
11.2	Empfindlichkeit	24
11.3	Spezifität	24
11.4	LOD ₅₀	24
12	Untersuchungsbericht	24
Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens		25
Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien und Reagenzien		27
B.1	Alkalisches Peptonwasser (APW)	27
B.1.1	Zusammensetzung	27
B.1.2	Herstellung	27
B.2	Thiosulfat-Citrat-Galle- und Saccharose-Agar (TCBS)	27
B.2.1	Zusammensetzung	27
B.2.2	Herstellung	28
B.2.3	Herstellung der Agarplatten	28
B.3	Kochsalz-Nähragar (SNA)	28
B.3.1	Zusammensetzung	28
B.3.2	Herstellung	28
B.3.3	Herstellung der Agarplatten	28
B.3.4	Herstellung der Schrägagarröhrchen mit Kochsalz-Nähragar	28
B.4	Reagenz für den Nachweis von Oxidase	29
B.4.1	Zusammensetzung	29
B.4.2	Herstellung	29
B.5	L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC)	29
B.5.1	Zusammensetzung	29
B.5.2	Herstellung	29
B.6	Arginin-Dihydrolase-Salzmedium (ADH)	29
B.6.1	Zusammensetzung	29
B.6.2	Herstellung	30
B.7	Nachweis von β -Galactosidase	30
B.7.1	ONPG-Lösung	30
B.7.2	Pufferlösung	30
B.7.3	Vollständiges Reagenz	30
B.8	Salzmedium für den Nachweis von Indol	31
B.8.1	Tryptophan-Salzmedium	31
B.8.2	Kovacs-Reagenz	31
B.9	Salzhaltiges Peptonwasser	31
B.9.1	Zusammensetzung	31
B.9.2	Herstellung	31
B.10	Natriumchloridlösung	32
B.10.1	Zusammensetzung	32
B.10.2	Herstellung	32
B.11	Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	32
B.11.1	Zusammensetzung	32
B.11.2	Herstellung	32
B.12	Leistungsprüfung	32
Anhang C (informativ) Konventionelle PCR für den Nachweis von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , Genen des thermostabilen direkten Hämolsins (<i>tdh</i>) und des thermostabilen direkten verwandten Hämolsins (<i>trh</i>), <i>Vibrio cholerae</i> und <i>Vibrio vulnificus</i>		37
C.1	Zusammensetzung des Mastermix	37
C.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> -Primer (konventionelle PCR)	37
C.3	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> -Primer für Gene des thermostabilen direkten Hämolsins (<i>tdh</i>) und des thermostabilen direkten verwandten Hämolsins (<i>trh</i>) (konventionelle PCR)	37
C.4	<i>Vibrio cholerae</i> -Primer (konventionelle PCR)	38
C.5	<i>Vibrio vulnificus</i> -Primer (konventionelle PCR)	38

C.6 Zyklusparameter — *VptoxR* und *VVH* 38

C.7 Zyklusparameter — *prVC* 38

C.8 Zyklusparameter — *tdh* und *trh* 39

C.9 Kontrollmaterial — konventionelle PCR 39

C.10 Ringversuch 40

Anhang D (informativ) Real-Time-PCR für den Nachweis von *Vibrio parahaemolyticus*, dem Gen des thermostabilen direkten Hämolsins (*tdh*) und *Vibrio vulnificus* 42

D.1 Zusammensetzung des Mastermix 42

D.2 *Vibrio parahaemolyticus* — Primer und Hydrolyse-Sonden 42

D.3 *Vibrio-parahaemolyticus* — Primer und Hydrolyse-Sonden für das Gen des thermostabilen direkten Hämolsins (*tdh*) 42

D.4 *Vibrio vulnificus* — Primer und Hydrolyse-Sonden 43

D.5 Zyklusparameter 43

D.6 Kontrollmaterial — Real-Time-PCR 44

Anhang E (informativ) Ergebnisse eines Ringversuchs 45

Literaturhinweise 49

Bilder

Bild A.1 — Fließschema des Verfahrens für den Nachweis von enteropathogenen *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* 26

Tabellen

Tabelle 2 — Primäre Bebrütung und Zielspezies/Produktzustand 16

Tabelle 3 — Sekundäre Bebrütung und Zielspezies/Produktzustand 17

Tabelle 4 — Interpretation der biochemischen Untersuchungen 20

Tabelle B.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien 32

Tabelle B.2 — Leistungsprüfung von Bestätigungsmedien und Reagenzien 33

Tabelle C.1 — Zusammensetzung des Mastermix 37

Tabelle C.2 — Zyklusparameter — *VptoxR* und *VVH* 38

Tabelle C.3 — Zyklusparameter — *prVC* 38

Tabelle C.4 — Zyklusparameter — *tdh* und *trh* 39

Tabelle C.5 — Referenzstämme 39

Tabelle C.6 — Daten des Ringversuchs 40

Tabelle D.1 — Zusammensetzung des Mastermix 42

Tabelle D.2 — Zyklusparameter 43

Tabelle D.3 — Referenzstämme 44

Tabelle E.1 — Ergebnisse der Datenanalyse von *Vibrio parahaemolyticus* in rohen Austern 45

Tabelle E.2 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalysen von *tdh* und *trh* für *Vibrio parahaemolyticus* in rohen Austern 46

Tabelle E.3 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalyse mit *Vibrio vulnificus* in rohen Austern 46

Tabelle E.4 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalyse mit *Vibrio cholerae* in gekochten Garnelen 46

Tabelle E.5 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalyse mit *Vibrio vulnificus* in gekochten Garnelen 47

Tabelle E.6 — Erzielte Ergebnisse der Datenanalyse mit *Vibrio parahaemolyticus* in gekochten Garnelen 47

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 21872-1:2017) 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 Januar 2018, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Januar 2018 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 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 21872-1:2017 wurde von CEN als EN ISO 21872-1:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

▣_{A1} Europäisches Vorwort der Änderung 1

Dieses Dokument (EN ISO 21872-1:2017/A1:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Diese Änderung zur Europäischen Norm EN ISO 21872-1:2017 muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis September 2023, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis September 2023 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.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut/nationale Gremium des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, 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 21872-1:2017/Amd 1:2023 wurde von CEN als EN ISO 21872-1:2017/A1:2023 ohne irgendeine Abänderung genehmigt. ▣_{A1}

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 Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der WTO-Grundsätze 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 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 erste Ausgabe ersetzt ISO/TS 21872-1:2007, die technisch überarbeitet wurde. Es enthält auch die Technische Berichtigung ISO/TS 21872-1:2007/Cor.1:2008.

Die wichtigsten Änderungen sind folgende:

- Einführung eines optionalen molekularen Verfahrens zur Identifizierung wesentlicher lebensmittelassoziierter *Vibrio* spp. (*V. parahaemolyticus* einschließlich potentiell enteropathogener Stämme, *V. vulnificus* und *V. cholerae*);
- die Leistungsmerkmale des Verfahrens wurden in Anhang E hinzugefügt.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 21872 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

A1 Vorwort der Änderung 1

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO 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 staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Directives, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Directives, 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 erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 463, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden. **A1**

Einleitung

Aufgrund der großen Vielfalt an Lebens- und Futtermittelprodukten ist das in diesem Dokument beschriebene horizontale Verfahren möglicherweise nicht in allen Einzelheiten für bestimmte Produkte geeignet. In diesem Fall können andere Verfahren, die spezifisch für diese Produkte sind, angewendet werden, wenn dies aus berechtigten technischen Gründen eindeutig notwendig ist. Dennoch werden alle Anstrengungen unternommen, dieses horizontale Verfahren soweit wie möglich anzuwenden.

Die wichtigsten im Vorwort angegebenen und in diesem Dokument im Vergleich zu ISO/TS 21872-1:2007 eingeführten Änderungen werden als wesentlich betrachtet (siehe ISO 17468).

Bei der nächsten Überarbeitung dieses Dokuments werden sämtliche dann zur Verfügung stehenden Informationen über die Umsetzung dieses horizontalen Verfahrens und die Gründe für Abweichungen von diesem Verfahren 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 ihrer Überarbeitung an dieses Dokument angepasst werden, sodass es sich bei den verbleibenden Abweichungen von diesem horizontalen Verfahren letztendlich nur um solche mit etablierten technischen Gründen handelt.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein horizontales Verfahren zum Nachweis von enteropathogenen *Vibrio* spp. fest, die Erkrankungen des Menschen am oder über den Darmtrakt verursachen. Die Spezies, deren Nachweis die hier aufgeführten Verfahren einbeziehen, sind *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus*.

Das Dokument gilt für

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

ANMERKUNG 1 Dieses Verfahren ist für bestimmte Produkte möglicherweise nicht in allen Einzelheiten geeignet (siehe Einleitung).

ANMERKUNG 2 Die Weltgesundheitsorganisation (WHO; en: World Health Organization) hat *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* als die wichtigsten lebensmittelassoziierten *Vibrio* spp. identifiziert. Das Verfahren in diesem Dokument kann jedoch ebenso für die Identifizierung anderer *Vibrio* spp., die Erkrankungen des Menschen verursachen, geeignet sein [1].

WARNUNG — Um die Gesundheit von Laborpersonal sicherzustellen, ist es unerlässlich, dass Untersuchungen zum Nachweis von *Vibrio* spp. und insbesondere von toxischen *Vibrio cholerae* nur in ordnungsgemäß ausgestatteten Laboratorien unter der Aufsicht eines erfahrenen Mikrobiologen vorgenommen werden und dass das gesamte kontaminierte Material mit größter Sorgfalt entsorgt wird.

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 6887-1:2017, *Microbiology of the food chain — 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 6887-3, *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products*

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*

ISO 22118, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens — Performance characteristics*

ISO 22119, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions*

ISO 22174, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions*

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 Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

potentiell enteropathogene *Vibrio* spp.

Mikroorganismen, die typische Kolonien auf festen Selektivmedien bilden und bei der Untersuchung nach diesem Dokument die beschriebenen biochemischen oder molekularen Eigenschaften aufweisen

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieses Dokument beschreibt spezielle Verfahren für *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus*.

3.2

Nachweis von potentiell enteropathogenen *Vibrio* spp.

Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit potentiell enteropathogener *Vibrio* spp. (3.1) (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus*) in einer vorgegebenen Produktmenge, wenn die Untersuchung nach diesem Dokument durchgeführt wird

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Der Nachweis von potentiell enteropathogenen *Vibrio* spp. (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus*) erfordert vier aufeinanderfolgende Schritte, wie im Fließschema des Verfahrens in Anhang A dargestellt.

Die Wiederfindung bestimmter *Vibrio* spp. aus Lebensmitteln kann in Abhängigkeit von der Ziel-Spezies oder dem Zustand der Lebensmittelmatrix durch verschiedene Bebrütungstemperaturen verbessert werden. So wird beispielsweise die Wiederfindung von *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* in frischen Produkten durch Anreicherung bei 41,5 °C gesteigert, wohingegen die Wiederfindung von *V. vulnificus*, und *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* in tiefgeköhlten (<-18°C) [2], getrockneten oder gepökelten Produkten durch Anreicherung bei 37 °C verbessert wird. Wenn der Nachweis von *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* erforderlich ist, sollten alle angegebenen Bebrütungstemperaturen verwendet werden. Wenn kein paralleler Nachweis von *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* erforderlich ist, darf/dürfen das/die spezifische(n) Verfahren entsprechend der gesuchten Spezies gewählt werden. Solch eine Auswahl sollte klar im Untersuchungsbericht angegeben werden.

ANMERKUNG *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* können in geringer Anzahl anwesend sein und kommen häufig gemeinsam mit einer beträchtlich größeren Anzahl von anderen Mikroorganismen aus der Familie der *Vibrionaceae* oder anderen Familien vor.

4.2 Primäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium

Das primäre Anreicherungsmedium, alkalisches Peptonwasser (APW, en: alkaline saline peptone water, ASPW) (5.1), wird bei Umgebungstemperatur mit der Prüfmenge beimpft und dann für 6 h bei 41,5 °C und/oder für 6 h bei 37 °C bebrütet.

Die Bebrütungsbedingungen richten sich nach der Ziel-Spezies und dem Zustand des Lebensmittelprodukts.

Für den Nachweis jeglicher Zielspezies in tiefgefrorenen, getrockneten oder gepökelten Produkten sollte die primäre Anreicherung bei 37 °C erfolgen.

Für den Nachweis von *V. vulnificus* in jeglichen Produkten sollte die primäre Anreicherung bei 37 °C erfolgen.

Für den Nachweis von nur *V. parahaemolyticus* und/oder *V. cholerae* in frischen Produkten sollte die primäre Anreicherung bei 41,5 °C erfolgen.

4.3 Sekundäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium

Das zweite Anreicherungsmedium (APW) wird mit den in 4.2 erhaltenen Kulturen beimpft.

Die Bebrütung des beimpften Anreicherungsmediums erfolgt für 18 h bei 41,5 °C und/oder 18 h bei 37 °C.

Für den Nachweis von *V. vulnificus* in jeglichen Produkten sollte die sekundäre Anreicherung bei 37 °C erfolgen.

Für den Nachweis von nur *V. parahaemolyticus* und/oder *V. cholerae* in jeglichen Produkten sollte die sekundäre Anreicherung bei 41,5 °C erfolgen.

4.4 Isolierung und Identifizierung

Die folgenden zwei festen Selektivmedien werden mit den in 4.2 und 4.3 erhaltenen Kulturen beimpft:

- Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar-Medium (TCBS, en: thiosulfate citrate bile and sacrose agar) (5.2.1);
- ein weiteres geeignetes festes Selektivmedium (bleibt der Auswahl des Labors überlassen), wie chromogener Agar, ergänzend zum TCBS-Medium (5.2.2).

Das TCBS-Medium wird bei 37 °C bebrütet und nach 24 h untersucht. Das zweite Selektivmedium wird nach den Empfehlungen des Herstellers bebrütet.

4.5 Bestätigung

Die nach 4.4 isolierten präsumtiven Kolonien von *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* werden subkultiviert und durch geeignete biochemische Untersuchungen und/oder Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Untersuchungen bestätigt.

Biochemische und/oder PCR-Bestätigungen der Isolate dürfen zur Identifizierung der Spezies durchgeführt werden. Ein zuverlässiger Nachweis von enteropathogenen *V. parahaemolyticus*, ermittelt durch die Anwesenheit von thermostabilen direkten Hämolsin (*tdh*)- und/oder direkt verwandten Hämolsin (*trh*)-Genen, kann jedoch nur durch PCR-Untersuchungen erfolgen.

Es wurde gezeigt, dass beim Screening von APW-Bouillons mit konventioneller PCR das Ausbleiben einer Amplifikation von *Vp-toxR* auf einen Nicht-Nachweis von *V. parahaemolyticus* hinweisen kann [3]. Um den anschließenden Untersuchungsaufwand zu reduzieren und sofern das anwendende Labor die Zuverlässigkeit nachweisen kann, dürfen bebrütete Anreicherungs-Bouillons gescreent werden. Dieses Verfahren wird nur nach einer sekundären Anreicherung empfohlen und gilt nicht für molekulare Zielsequenzen anderer *Vibrio* spp.

ANMERKUNG 1 Im Rahmen der Erstellung dieses Dokuments generierte Validierungsdaten haben gezeigt, dass eine PCR-basierte Identifizierung von *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und *V. cholerae* durch konventionelle PCR bzw. von *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* durch Real-Time-PCR möglich ist. Die PCR-Verfahren für die Entwicklung dieses Dokuments sind in Anhang C und Anhang D aufgeführt.

ANMERKUNG 2 Validierungsdaten zum Screening sekundärer Anreicherungs-Bouillons zur Amplifikation von *Vp-toxR* wurden bei der Erstellung dieses Dokuments nicht erfasst.

5 Nährmedien und Reagenzien

Zur allgemeinen Laborpraxis wird auf ISO 7218 verwiesen.

Aus Gründen der textlichen Übersichtlichkeit werden Einzelheiten zur Zusammensetzung der Nährmedien und Reagenzien sowie deren Herstellung in Anhang B beschrieben.

A1 Zur Leistungsprüfung von Nährmedien und Reagenzien werden die Verfahren nach ISO 11133 und Abschnitt B.12 befolgt. **A1**

ANMERKUNG Die für die Entwicklung dieses Dokuments verwendeten Primer, Sonden und PCR-Bedingungen sind in Anhang C und Anhang D aufgeführt.

5.1 Anreicherungsmedium: alkalisches Peptonwasser (APW)

Wie in Abschnitt B.1 festgelegt.

5.2 Festes selektives Isolierungsmedium

5.2.1 Erstes Medium: Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar-Medium

Wie in Abschnitt B.2 festgelegt. **A1** *gestrichener Text und gestrichene Tabelle 1* **A1**

5.2.2 Zweites Medium

Die Auswahl des zweiten Mediums ist dem Untersuchungslabor überlassen. Die Herstellung des Mediums sollte streng nach den Anweisungen des Herstellers erfolgen.

5.3 Kochsalz-Nähragar (SNA, en: Saline nutrient agar)

Wie in Abschnitt B.3 festgelegt.

5.4 Reagenz für den Nachweis von Oxidase

Wie in Abschnitt B.4 festgelegt.

5.5 Biochemische Untersuchungen

5.5.1 L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC)

Wie in Abschnitt B.5 festgelegt.

5.5.2 Arginin-Dihydrolase-Salzmedium (ADH)

Wie in Abschnitt B.6 festgelegt.

5.5.3 Reagenz für den Nachweis von β -Galactosidase

Wie in Abschnitt B.7 festgelegt.

5.5.4 Salzmedium für den Nachweis von Indol

Wie in Abschnitt B.8 festgelegt.

5.5.5 Salzhaltige Peptonwasser

Wie in Abschnitt B.9 festgelegt.