

DIN EN ISO 6579-1



ICS 07.100.30

Ersatz für
DIN EN ISO 6579:2007-10 und
DIN EN ISO 6785:2007-09

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur
Serotypisierung von Salmonellen –
Teil 1: Nachweis von *Salmonella* spp. (ISO 6579-1:2017);
Deutsche Fassung EN ISO 6579-1:2017**

Microbiology of the food chain –
Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* –
Part 1: Detection of *Salmonella* spp. (ISO 6579-1:2017);
German version EN ISO 6579-1:2017

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* –
Partie 1: Recherche des *Salmonella* spp. (ISO 6579-1:2017);
Version allemande EN ISO 6579-1:2017

Gesamtumfang 66 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 6579-1:2017) 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 707	siehe DIN EN ISO 707
ISO 6579:2002	siehe DIN EN ISO 6579:2002-12
ISO 6579:2002/Amd 1:2007	siehe DIN EN ISO 6579:2007-10
ISO 6785:2001	siehe DIN EN ISO 6785:2007-09
ISO 6887 (alle Teile)	siehe DIN EN ISO 6887 (alle Teile)
ISO 6887-1:2017	siehe DIN EN ISO 6887-1:2017-xx*)
ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 11133:2014	siehe DIN EN ISO 11133:2015-01
ISO 16140:2003	siehe DIN EN ISO 16140:2003-09
ISO 16140-1	siehe DIN EN ISO 16140-1
ISO 16140-2	siehe DIN EN ISO 16140-2
ISO 17468	siehe DIN EN ISO 17468
ISO 18593	siehe DIN ISO 18593
ISO 13307	siehe DIN EN ISO 13307
ISO 17604	siehe DIN EN ISO 17604
ISO/TR 6579-3	siehe DIN CEN ISO/TR 6579-3
ISO/TS 6579-2	siehe DIN CEN ISO/TS 6579-2, DIN SPEC 10052
ISO/TS 17728	siehe DIN CEN ISO/TS 17728; DIN SPEC 10053

*) Noch nicht erschienen, Veröffentlichung wird 2017 erwartet.

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 6579:2007-10 und DIN EN ISO 6785:2007-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die DIN EN ISO 6785:2007-09 „*Milch und Milcherzeugnisse — Nachweis von Salmonella spp.*“ wurde in diese Norm DIN EN ISO 6579-1 mit einbezogen;
- b) der Anwendungsbereich beinhaltet auch Proben aus der Primärproduktion;
- c) in einem Normativen Anhang wird der Nachweis von *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Paratyphi beschrieben;
- d) für die selektive Anreicherung besteht die Wahl zwischen der Verwendung der Bouillon oder des halbfesten Agars aus Rappaport-Vassiliadis-Medium (RVS oder MSRV);
- e) die Beimpfung des Isolierungsmediums wird weniger streng festgelegt. Das Ziel besteht im Erhalt gut voneinander abgesetzter einzelner Kolonien nach der Bebrütung;
- f) für die Bestätigung ist es zulässig, die Untersuchungen an nur einer verdächtigen Kolonie (anstatt an einer verdächtigen Kolonie von jeder Medienkombination) durchzuführen. Wenn diese Untersuchungen des Isolats in Bezug auf *Salmonella* negativ sind, müssen 4 weitere verdächtige Isolate aus verschiedenen Medienkombinationen untersucht werden;
- g) es ist erlaubt, die biochemische Bestätigung direkt an einer verdächtigen, gut von den anderen abgesetzten Kolonie von dem selektiven Ausplattierungsmedium durchzuführen. Die Überprüfung der Reinheit auf nicht selektivem Agarmedium kann anschließend parallel durchgeführt werden;
- h) zwei Bestätigungsuntersuchungen sind wahlfrei geworden (β -Galactosidase-Test und Indol-Reaktion), eine Bestätigungsuntersuchung wurde gestrichen (Voges-Proskauer-Reaktion);
- i) im vorliegenden Teil von ISO 6579 wird die serologische Bestätigung (bis zur Ebene der Serogruppe) beschrieben. Hinsichtlich eines Leitfadens zur Serotypisierung [bis zur Ebene des Serovars (Serotyps)] wird auf ISO 6579-3 verwiesen;
- j) Tabelle 1 (Beurteilung der biochemischen Untersuchungen) wurde verbessert;
- k) die Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien wurde zu Anhang B hinzugefügt;
- l) die Leistungsmerkmale von MSRV wurden zu Anhang C hinzugefügt;
- m) das gesamte Dokument wurde redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN 12824: 1998-02

DIN EN ISO 6579: 2002-12, 2003-03, 2007-10

DIN EN ISO 6785: 2007-09

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TS 6579-2, DIN SPEC 10052, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen — Teil 2: Zählung unter Anwendung eines miniaturisierten Verfahrens der wahrscheinlichsten Keimzahl*

DIN CEN ISO/TR 6579-3, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen — Teil 3: Leitfaden für die Serotypisierung von Salmonella spp.*

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

DIN EN ISO 707, *Milch und Milcherzeugnisse — Leitfaden zur Probenahme*

DIN EN ISO 6579:2002-12, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonella spp. (ISO 6579:2002); Deutsche Fassung EN ISO 6579:2002*

DIN EN ISO 6579:2007-10, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonella spp. (ISO 6579:2002+Amd 1:2007); Deutsche Fassung EN ISO 6579:2002+A1:2007*

DIN EN ISO 6785:2007-09, *Milch und Milcherzeugnisse — Nachweis von Salmonella spp. (ISO 6785:2001); Deutsche Fassung EN ISO 6785:2007*

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 16140-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 1: Terminologie*

DIN EN ISO 16140-2, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens*

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 6887-1:2017-xx, *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 7218, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen*

DIN EN ISO 11133:2015-01, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

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

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

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

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

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Mikrobiologie der Lebensmittelkette —
Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und
zur Serotypisierung von Salmonellen —
Teil 1: Nachweis von *Salmonella* spp.
(ISO 6579-1:2017)

Microbiology of the food chain —
Horizontal method for the detection, enumeration
and serotyping of *Salmonella* —
Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
(ISO 6579-1:2017)

Microbiologie de la chaîne alimentaire —
Méthode horizontale pour la recherche, le
dénombrement et le sérotypage des *Salmonella* —
Partie 1: Recherche des *Salmonella* spp.
(ISO 6579-1:2017)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 3. Februar 2017 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

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

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	9
4.1 Allgemeines	9
4.2 Voranreicherung in einem nicht selektiven, flüssigen Medium	9
4.3 Anreicherung in/auf selektiven Medien	9
4.4 Ausplattierung auf festen Selektivmedien	9
4.5 Bestätigung	10
5 Nährmedien, Reagenzien und Antiseren	10
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien	10
7 Probenahme	11
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	11
9 Durchführung (siehe Fließschemata in Anhang A)	11
9.1 Einwaage und Erstverdünnung	11
9.2 Nicht selektive Voranreicherung	12
9.3 Selektive Anreicherung	12
9.3.1 Allgemeines	12
9.3.2 Vorgehensweise für Lebensmittel, Futtermittel- und Umgebungsproben aus dem Bereich der Lebensmittelherstellung	12
9.3.3 Vorgehensweise für Proben aus der Primärproduktion	13
9.4 Ausplattierung	13
9.4.1 Allgemeines	13
9.4.2 Vorgehensweise für Lebensmittel, Futtermittel- und Umgebungsproben aus dem Bereich der Lebensmittelherstellung	13
9.4.3 Verfahrensweise für Proben aus der Primärproduktion	14
9.5 Bestätigung	14
9.5.1 Allgemeines	14
9.5.2 Auswahl der Kolonien für die Bestätigung	15
9.5.3 Biochemische Untersuchung	15
9.5.4 Serologische Untersuchung	19
9.5.5 Interpretation der biochemischen und serologischen Reaktionen	20
9.5.6 Serotypisierung	20
10 Angabe der Ergebnisse	20
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens	20
11.1 Ringversuche	20
11.2 Empfindlichkeit	20
11.3 Spezifität	21

11.4	LOD ₅₀	21
12	Untersuchungsbericht	21
Anhang A (normativ) Fließschemata der Verfahren		22
Anhang B (normativ) Nährmedien und Reagenzien		24
Anhang C (informativ) Untersuchungen zur Methodenvvalidierung und Leistungsmerkmale des Verfahrens		41
Anhang D (normativ) Nachweis von <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> Serovare Typhi und Paratyphi		48
Anhang E (informativ) Beispiele für einige selektive Ausplattierungsmedien		54
Literaturhinweise		58

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 6579-1:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird, in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ erarbeitet.

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

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 6579:2002 und EN ISO 6785:2007.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das 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 6579-1:2017 wurde von CEN als EN ISO 6579-1:2017 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 der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Europäischen Komitee für Normung (CEN), 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 erste Ausgabe von ISO 6579-1 ersetzt ISO 6579:2002 und ISO 6785:2001, die technisch überarbeitet wurden. Sie enthält auch ISO 6579:2002/Amd.1:2007 und ISO 6579:2002/Cor.1:2004.

Die wichtigsten Änderungen in dieser ersten Ausgabe im Vergleich zu ISO 6579:2002 sind folgende:

- ISO 6785 wurde in dieses Dokument aufgenommen.
- Proben aus der Primärproduktion wurden in den Anwendungsbereich hinzugefügt.
- Der Nachweis von *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Paratyphi wird in Anhang D beschrieben.
- Beschreibungen der Herstellung von Erstverdünnungen wurden entfernt und nach Möglichkeit wurde auf die betreffenden Teile von ISO 6887 verwiesen.
- Der Temperaturbereich für die Bebrütung von nicht selektiven Medien wurde von $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ auf $34 ^\circ\text{C}$ bis $38 ^\circ\text{C}$, ohne weitere Grenzabweichung, erweitert.

- Für die selektive Anreicherung besteht bei Lebensmittel- und Futtermittelproben sowie Umgebungsproben aus dem Bereich der Herstellung von Lebensmitteln die Wahl zwischen der Verwendung der Bouillon oder des halbfesten Agars aus Rappaport-Vassiliadis-Medium (RVS oder MSRV).
- Die Beimpfung des Isolierungsmediums wird weniger streng vorgeschrieben. Das Ziel besteht im Erhalt gut voneinander abgesetzter einzelner Kolonien nach der Bebrütung.
- Für die Bestätigung ist es zulässig, die Untersuchungen an nur einer verdächtigen Kolonie (anstelle von einer verdächtigen Kolonie von jeder Medienkombination) durchzuführen. Wenn diese Untersuchung des Isolats in Bezug auf *Salmonella* negativ ist, müssen vier weitere verdächtige Isolate aus verschiedenen Medienkombinationen untersucht werden.
- Es ist zulässig, die biochemische Bestätigung direkt an einer verdächtigen, gut abgesetzten Einzelkolonie von dem selektiven Ausplattierungsmedium durchzuführen. Die Überprüfung der Reinheit auf nicht selektivem Agarmedium kann anschließend parallel durchgeführt werden.
- Zwei Bestätigungsuntersuchungen sind wahlfrei geworden (Untersuchung auf β -Galactosidase und Indol-Reaktion) und eine Bestätigungsuntersuchung wurde gestrichen (Voges-Proskauer-Reaktion).
- In diesem Dokument wird die serologische Bestätigung (bis zur Ebene der Serogruppe) beschrieben. Hinsichtlich eines Leitfadens zur Serotypisierung (bis zur Ebene des Serovars (Serotyps)) wird auf ISO/TR 6579-3 verwiesen.
- Tabelle 1 wurde verbessert.
- Die Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien wurde zu Anhang B hinzugefügt.
- Die Leistungsmerkmale von MSRV wurden zu Anhang C hinzugefügt.

Eine Liste aller Teile von ISO 6579 ist auf der ISO-Internetseite zu finden.

Einleitung

Dieses Dokument beschreibt ein horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. in Lebensmitteln (einschließlich Milch und Milcherzeugnissen, ursprünglich in ISO 6785 beschrieben), Futtermitteln, Tierkot und in Umgebungsproben aus der Primärproduktion (die beiden letzteren wurden ursprünglich in ISO 6579:2002/Amd.1:2007 beschrieben).

Die wesentlichen im Vorwort angegebenen und in diesem Dokument im Vergleich zu ISO 6579:2002 eingeführten Änderungen werden als geringfügig betrachtet (siehe ISO 17468 [37]).

Ein Verfahren zur Zählung von *Salmonella* spp. ist in ISO/TS 6579-2 [3] beschrieben.

Ein Leitfaden zur Serotypisierung von *Salmonella* spp. ist in ISO/TR 6579-3 [24] beschrieben.

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

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonellen fest. Es gilt für Folgendes:

- Produkte, die für den menschlichen Verzehr oder als Futtermittel bestimmt sind;
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung von Lebensmitteln und beim Umgang mit Lebensmitteln;
- Proben aus der Primärproduktion, wie Tierkot, Staub und Tupfer.

Mit diesem horizontalen Verfahren sollen die meisten der *Salmonella*-Serovare nachgewiesen werden. Für den Nachweis einiger spezifischer Serovare können zusätzliche Kultivierungsschritte notwendig sein. Für *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Paratyphi ist die Durchführung in Anhang D beschrieben.

Das selektive Anreicherungsmedium modifizierter halbfester Rappaport-Vassiliadis(MSRV)-Agar ist für den Nachweis von beweglichen Salmonellen vorgesehen und ist für den Nachweis von unbeweglichen Salmonellen-Stämmen nicht geeignet.

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 food and animal feed — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

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

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgende Begriffe.

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

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

3.1

Salmonellen

Mikroorganismen, die typische oder weniger typische Kolonien auf festen Selektivmedien bilden und bei Bestätigungsuntersuchungen nach den in diesem Dokument festgelegten Verfahren die beschriebenen Eigenschaften aufweisen

3.2

Nachweis von Salmonellen

Ermittlung von Salmonellen (3.1) in einer vorgegebenen Masse oder einem vorgegebenen Volumen eines Produkts, oder auf einer vorgegebenen Fläche oder auf einem Gegenstand (z. B. Sockentupfer) bei der Untersuchung nach den in diesem Dokument festgelegten Verfahren

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Der Nachweis von Salmonellen erfordert vier aufeinander folgende Schritte, wie in Anhang A festgelegt.

ANMERKUNG Salmonellen können in geringer Anzahl anwesend sein und kommen häufig gemeinsam mit einer beträchtlich größeren Anzahl von anderen *Enterobacteriaceae* oder Bakterien von anderen Familien vor. Die Voranreicherung erfolgt, um den Nachweis einer geringen Anzahl von Salmonellen oder geschädigter Salmonellen zu ermöglichen.

4.2 Voranreicherung in einem nicht selektiven, flüssigen Medium

Gepuffertes Peptonwasser (en: buffered peptone water, BPW) bei Umgebungstemperatur wird mit der Einwaage beimpft und dann für 18 h bei einer Temperatur zwischen 34 °C und 38 °C bebrütet.

Bei großen Mengen (z. B. 1 l oder mehr) wird empfohlen, das BPW vor dem Mischen mit der Einwaage auf 34 °C bis 38 °C vorzuwärmen.

4.3 Anreicherung in/auf selektiven Medien

Rappaport-Vassiliadis-Medium mit Soja (RVS-Bouillon) oder modifizierter halbfester Agar nach Rappaport-Vassiliadis (MSRV) und eine Muller-Kauffmann-Tetrathionat-Novobiocin-Bouillon (MKTn-Bouillon) werden mit der nach 4.2 erhaltenen Kultur beimpft.

Die RVS-Bouillon oder der MSRV-Agar wird 24 h bei 41,5 °C und die MKTn-Bouillon wird 24 h bei 37 °C bebrütet.

Bei einigen Produkten kann es notwendig sein, das (die) selektive(n) Anreicherungsmedium (Anreicherungsmedien) weitere 24 h zu bebrüten.

ANMERKUNG MSRV-Agar ist für den Nachweis von beweglichen *Salmonella*-Stämmen vorgesehen und nicht für den Nachweis von unbeweglichen *Salmonella*-Stämmen geeignet.

4.4 Ausplattierung auf festen Selektivmedien

Die folgenden zwei festen Selektivmedien werden mit den nach 4.3 erhaltenen Kulturen beimpft:

- Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar);
- ein beliebiges anderes festes Selektivmedium zur Ergänzung von XLD-Agar (für Beispiele siehe Anhang E).

Der XLD-Agar wird bei 37 °C bebrütet und nach 24 h untersucht. Der zweite Selektivagar wird nach den Anweisungen des Herstellers bebrütet.

4.5 Bestätigung

Kolonien von präsumtiven Salmonellen werden subkultiviert und ihre Identität wird mit geeigneten biochemischen und serologischen Untersuchungen bestätigt.

5 Nährmedien, Reagenzien und Antiseren

Zur üblichen Laborpraxis siehe ISO 7218 und ISO 11133.

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

6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

Geräte zum Einmalgebrauch mit geeigneten Kennwerten sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

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

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

Wie in ISO 7218 festgelegt.

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

6.3 Brutschrank (Brutschränke), auf einen Bereich zwischen 34 °C und 38 °C und auf (37 ± 1) °C einstellbar.

6.4 Brutschrank, auf $(41,5 \pm 1)$ °C einstellbar, oder Wasserbad, auf $(41,5 \pm 1)$ °C einstellbar.

6.5 Wasserbad, auf 47 °C bis 50 °C einstellbar.

6.6 Wasserbad, auf (37 ± 1) °C einstellbar.

6.7 Wasserbad, auf (45 ± 1) °C einstellbar.

Wegen der niedrigen Infektionsdosis von Salmonellen wird empfohlen, ein Wasserbad (6.4 bis 6.7) zu verwenden, das einen antibakteriellen Wirkstoff enthält.

6.8 Kühlschrank, der bei (5 ± 3) °C betrieben werden kann.

6.9 Tiefkühleinrichtung, die bei (-20 ± 5) °C betrieben werden kann.

6.10 Sterile Impfösen, von ungefähr 3 mm Durchmesser (10 µl Volumen) und mit einem Volumen von 1 µl sowie Impfnadel oder Impfdraht.

6.11 pH-Messgerät, mit einer Fehlergrenze der Kalibrierung von $\pm 0,1$ pH-Einheit bei 20 °C bis 25 °C.

6.12 Sterile Kulturröhrchen, -flaschen oder -kolben mit Verschlüssen, von geeignetem Fassungsvermögen.

6.13 Sterile Messpipetten oder automatische Pipetten, Nennvolumen 25 ml, 10 ml, 1 ml und 0,1 ml.

6.14 Sterile Petrischalen, mit einem Durchmesser von etwa 90 mm und (optional) große Petrischalen (Durchmesser etwa 140 mm).

7 Probenahme

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

Ein empfohlenes Probenahmeverfahren für Lebens- und Futtermittel ist in ISO/TS 17728 [26], für Milch und Milcherzeugnisse in ISO 707 [27], für die Probenahme auf der Stufe der Primärproduktion in ISO 13307 [28], für die Probenahme von Schlachttierkörpern in ISO 17604 [29] und für die Probenahme von Oberflächen in ISO 18593 [25] angeführt.

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

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird nach der speziellen Internationalen Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, aus der Laborprobe vorbereitet. Liegt keine spezielle Internationale Norm vor, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

9 Durchführung (siehe Fließschemata in Anhang A)

9.1 Einwaage und Erstverdünnung

Das unter Anhang B.2 festgelegte Voranreicherungsmedium (gepuffertes Peptonwasser) wird im Allgemeinen als Verdünnungsmittel für die Herstellung der Erstverdünnung verwendet. Vor dem Gebrauch wird das BPW auf Raumtemperatur vorgewärmt.

Im Allgemeinen wird eine bestimmte Menge an Einwaage (Masse oder Volumen) so zu einer Menge an BPW (Masse oder Volumen) hinzugefügt, dass eine zehnfache Verdünnung erreicht wird. Hierfür werden 25 g Einwaage mit 225 ml BPW gemischt. Bei einigen Probenarten (z. B. Sockentupfer, Staub) kann es jedoch notwendig sein, ein anderes Verhältnis zu verwenden.

Bei spezifischen Produkten sind die in ISO 6887 (alle Teile) festgelegten Verfahren einzuhalten.

Dieses Dokument wurde für Einwaagen von 25 g validiert. Eine kleinere Einwaage darf ohne die Notwendigkeit einer zusätzlichen Validierung/Verifizierung verwendet werden, vorausgesetzt, dass zwischen der (Vor)Anreicherungsbouillon und der Einwaage dasselbe Verhältnis beibehalten wird. Eine größere Einwaage als die ursprünglich validierte darf verwendet werden, wenn in einer Validierungs-/Verifizierungsuntersuchung nachgewiesen wurde, dass keine nachteiligen Auswirkungen auf den Nachweis von *Salmonella* spp. vorliegen.

ANMERKUNG 1 Die Validierung kann nach den entsprechenden Teilen von ISO 16140 durchgeführt werden. Die Verifizierung bezüglich des Bündelns (Poolens) von Proben kann nach der in ISO 6887-1:2017 Anhang D [38] beschriebenen Verfahrensanweisung durchgeführt werden.

Bei großen Mengen (z. B. 1 l oder mehr) wird empfohlen, das BPW vor dem Mischen mit der Einwaage auf 34 °C bis 38 °C vorzuwärmen.

ANMERKUNG 2 Falls mehr als eine 25-g-Einwaage von einer festgelegten Produktcharge zu untersuchen ist und nachgewiesen werden kann, dass eine Vereinigung der einzelnen Einwaagen das Ergebnis für dieses spezielle Lebensmittel nicht beeinflusst, können die Einwaagen gebündelt (gepoolt) werden. Weiterführende Angaben zum Bündeln von Proben sowie ein Verfahren zur Untersuchung des Einflusses des Bündelns auf die Empfindlichkeit des Verfahrens sind in ISO 6887-1 [38] enthalten.

9.2 Nicht selektive Voranreicherung

Die Erstverdünnung (9.1) wird (18 ± 2) h bei einer Temperatur zwischen 34 °C und 38 °C (siehe 6.3) bebrütet.

Es ist zulässig, die vorangereicherte Probe nach der Bebrütung bei 5 °C (6.8) für höchstens 72 h aufzubewahren (siehe Literaturhinweise [30] bis [34]).

9.3 Selektive Anreicherung

9.3.1 Allgemeines

Wenn die selektiven Anreicherungsmedien, RVS-Bouillon oder MSRV-Agar (B.3 oder B.4) und die MKTTn-Bouillon (B.5) bei niedrigerer Temperatur aufbewahrt wurden, sind sie auf Raumtemperatur zu bringen.

Die Überführung von Feststoffen aus den Voranreichungs- in die selektiven Anreicherungsmedien ist auf ein Mindestmaß zu verringern.

Nach der Bebrütung ist eine Aufbewahrung der selektiven Anreicherung für höchstens 72 h bei 5 °C (6.8) zulässig (siehe Literaturhinweise [30] bis [34]).

ANMERKUNG MSRV-Agar ist für den Nachweis von beweglichen *Salmonella*-Stämmen vorgesehen und nicht für den Nachweis von unbeweglichen *Salmonella*-Stämmen geeignet.

9.3.2 Vorgehensweise für Lebensmittel, Futtermittel- und Umgebungsproben aus dem Bereich der Lebensmittelherstellung

0,1 ml der nach 9.2 erhaltenen Kultur werden in ein Kulturröhrchen überführt, das 10 ml RVS-Bouillon (B.3) enthält, oder auf die Oberfläche einer MSRV-Agar-Platte gegeben (B.4). Der MSRV-Agar wird mit ein bis drei Tropfen in gleichem Abstand voneinander auf der Oberfläche des Mediums beimpft.

1 ml der nach 9.2 erhaltenen Kultur werden in ein Kulturröhrchen überführt, das 10 ml MKTTn-Bouillon (B.5) enthält.

Die beimpfte RVS-Bouillon wird (24 ± 3) h bei 41,5 °C (6.4) bebrütet.

Die beimpften MSRV-Agar-Platten werden (24 ± 3) h bei 41,5 °C (6.4) bebrütet. **Die Platten dürfen nicht umgedreht werden.**

Die beimpfte MKTTn-Bouillon wird (24 ± 3) h bei 37 °C (6.3) bebrütet.

Verdächtige MSRV-Platten weisen eine grau-weiße, trübe Zone auf, die sich von dem aufgeimpften Tropfen aus ausdehnt.

In Milchtrockenprodukten und Käse können Salmonellen subletal geschädigt sein. Die selektiven Anreicherungsmedien von diesen Produkten werden für weitere (24 ± 3) h bebrütet (siehe Literaturhinweis [35]).

Bei einigen anderen Produkten, z. B. bei der Untersuchung von Proben im Zusammenhang mit einem Krankheitsausbruch, kann diese zusätzliche Bebrütungsdauer ebenfalls von Vorteil sein.

9.3.3 Vorgehensweise für Proben aus der Primärproduktion

Der MSRV-Agar (B.4) wird mit 0,1 ml der Voranreicherungskultur (9.2) in Form von einem Tropfen bis drei Tropfen in gleichem Abstand voneinander auf der Oberfläche des Mediums beimpft.

Die beimpften MSRV-Platten werden (24 ± 3) h bei 41,5 °C (6.4) bebrütet.

Die Platten dürfen nicht umgedreht werden.

Verdächtige MSRV-Platten weisen eine grau-weiße, trübe Zone auf, die sich von dem aufgeimpften Tropfen aus ausdehnt.

Wenn die Platten nach 24 h negativ sind, werden sie für weitere (24 ± 3) h bebrütet.

ANMERKUNG Die Empfindlichkeit kann durch Anwendung eines zweiten Verfahrens der selektiven Anreicherung verbessert werden, z. B. MKTTn-Bouillon, 24 h bei 41,5 °C bebrütet. [36]

9.4 Ausplattierung

9.4.1 Allgemeines

Zwei selektive Isolierungsagarmedien werden mit den selektiven Anreicherungskulturen (9.3) beimpft. Das erste Isolierungsmedium ist Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar). Das zweite Isolierungsmedium wird vom Untersuchungslaboratorium gewählt.

Es wird ein zweites selektives Ausplattierungsmedium gewählt, das eine Ergänzung zu XLD-Agar darstellt und auf anderen diagnostischen Merkmalen im Vergleich zu XLD-Agar beruht, um den Nachweis z. B. von lactosepositiven oder H₂S-negativen Salmonellen zu erleichtern. In Bezug auf Beispiele für Isolierungsmedien siehe Anhang E.

Wenn die XLD-Agar-Platten (B.6) und das zweite selektive Ausplattierungsmedium bei niedrigerer Temperatur aufbewahrt wurden, sind sie auf Raumtemperatur zu bringen. Falls notwendig, wird die Oberfläche der Platten vor der Verwendung getrocknet (siehe ISO 11133).

9.4.2 Vorgehensweise für Lebensmittel, Futtermittel- und Umgebungsproben aus dem Bereich der Lebensmittelherstellung

Die Oberfläche einer XLD-Platte (B.6) wird mit der in der RVS-Bouillon erhaltenen Kultur (9.3.2) mittels einer 10-µl-Impföse (6.10) so beimpft, dass gut voneinander abgegrenzte Einzelkolonien entstehen. In derselben Art und Weise wird das zweite selektive Ausplattierungsmedium beimpft.

Von dem auf dem MSRV-Agar erhaltenen positiven Wachstum (9.3.2) wird der von den Impfstellen am weitesten entfernte Punkt der trüben Schwärmzone bestimmt und eine 1-µl-Impföse (6.10) wird genau in den Rand der trüben Schwärmzone getaucht. Die Impföse wird herausgezogen, wobei sicherzustellen ist, dass keine großen Klumpen des MSRV-Agars entnommen werden. Die Oberfläche einer XLD-Platte (B.6) wird so beimpft, dass gut voneinander abgegrenzte Einzelkolonien erhalten werden. In derselben Art und Weise wird das zweite selektive Ausplattierungsmedium beimpft.

Die Oberfläche einer XLD-Platte (B.6) wird mit der in der MKTTn-Bouillon erhaltenen Kultur (9.3.2) mittels einer 10-µl-Impföse (6.10) so beimpft, dass gut voneinander abgegrenzte Einzelkolonien entstehen. In derselben Art und Weise wird das zweite selektive Ausplattierungsmedium beimpft.

ANMERKUNG 1 Um gut voneinander abgegrenzte Einzelkolonien zu erhalten, können große Petrischalen mit Ausplattierungsmedium (Durchmesser etwa 140 mm) oder zwei normalgroße Platten (Durchmesser etwa 90 mm) verwendet werden.

Die XLD-Platten werden in umgedrehtem Zustand bei 37 °C (6.3) (24 ± 3) h bebrütet.

Das zweite selektive Ausplattierungsmedium wird nach den Anweisungen des Herstellers bebrütet.

Wenn die selektiven Anreicherungsmedien für weitere 24 h bebrütet wurden, wird das gleiche Verfahren der Ausplattierung wie vorstehend beschrieben angewendet.

Typische Salmonellenkolonien auf XLD-Agar besitzen ein schwarzes Koloniezentrum und eine leicht transparente rötlich gefärbte Zone wegen des Indikatorfarbumschlags im Medium.

ANMERKUNG 2 Die auf XLD-Agar gewachsenen H₂S-negativen Varianten von Salmonellen sind rosa mit einem dunkleren rosafarbenen Zentrum. Die auf XLD-Agar gewachsenen lactosepositiven Salmonellen sind gelb mit oder ohne Schwärzung. Das Auftreten dieser Phänotypen ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Das zweite selektive Ausplattierungsmedium wird nach einer geeigneten Bebrütungsdauer auf Anwesenheit von charakteristischen Kolonien, die als präsumtive Salmonellen angesehen werden können, geprüft.

9.4.3 Verfahrensweise für Proben aus der Primärproduktion

Von dem auf dem MSRV-Agar erhaltenen positiven Wachstum (9.3.3) wird der von den Impfstellen am weitesten entfernte Punkt der trüben Schwärmzone bestimmt und eine 1-µl-Impföse (6.10) wird genau in den Rand der trüben Schwärmzone getaucht. Die Impföse wird herausgezogen, wobei sicherzustellen ist, dass keine großen Klumpen von MSRV-Agar entnommen werden. Die Oberfläche einer XLD-Platte wird so beimpft, dass gut voneinander abgesetzte Kolonien erhalten werden. In derselben Art und Weise wird das zweite selektive Ausplattierungsmedium beimpft.

Die XLD-Platten werden in umgedrehtem Zustand bei 37 °C (6.3) (24 ± 3) h bebrütet.

Das zweite selektive Ausplattierungsmedium wird nach den Anweisungen des Herstellers bebrütet.

Negative MSRV-Platten werden in den auf 41,5 °C eingestellten Brutschrank zurückgestellt und für weitere (24 ± 3) h bebrütet. Wenn diese MSRV-Platten nach einer Bebrütungsdauer von 48 h positiv sind, wird auf die festen Selektivnährböden ausplattiert.

Typische Salmonellenkolonien auf XLD-Agar besitzen ein schwarzes Koloniezentrum und eine leicht transparente rötlich gefärbte Zone wegen des Indikatorfarbumschlags im Medium.

ANMERKUNG Die auf XLD-Agar gewachsenen H₂S-negativen Varianten von Salmonellen sind rosa mit einem dunkleren rosafarbenen Zentrum. Die auf XLD-Agar gewachsenen lactosepositiven Salmonellen sind gelb mit oder ohne Schwärzung. Das Auftreten dieser Phänotypen ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Nach geeigneter Bebrütungsdauer wird das zweite selektive Ausplattierungsmedium auf Anwesenheit von charakteristischen Kolonien, die als präsumtive Salmonellen angesehen werden können, geprüft.

9.5 Bestätigung

9.5.1 Allgemeines

Die Kombination der Ergebnisse von biochemischen und serologischen Untersuchungen zeigt an, ob ein Isolat zur Gattung der *Salmonella* gehört. Zur Charakterisierung von Salmonellen-Stämmen wird eine vollständige Serotypisierung benötigt. Ein Leitfaden zur Serotypisierung ist in ISO/TR 6579-3 [24] beschrieben.