

DIN EN ISO 6785



ICS 07.100.30; 67.100.01

**Milch und Milcherzeugnisse –
Nachweis von *Salmonella* spp. (ISO 6785:2001);
Deutsche Fassung EN ISO 6785:2007**

Milk and milk products –
Detection of *Salmonella* spp. (ISO 6785:2001);
German version EN ISO 6785:2007

Lait et produits laitiers –
Recherche de *Salmonella* spp. (ISO 6785:2001);
Version allemande EN ISO 6785:2007

Gesamtumfang 30 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Die Europäische Norm EN ISO 6785:2007 fällt in den Zuständigkeitsbereich des Technischen Komitees CEN/TC 302 „Milch und Milchprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ (Sekretariat: NEN, Niederlande). Die ihr zugrunde liegende Internationale Norm ISO 6785:2001 wurde vom Unterkomitee SC 5 „Milk and milk products“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) des Technischen Komitees ISO/TC 34 „Agricultural food products“ (Sekretariat: MSZT, Ungarn) ausgearbeitet.

Aufgrund der Ergebnisse des einstufigen Annahmeverfahrens (UAP) wurde ISO 6785:2001 als Europäische Norm EN ISO 6785:2007 übernommen.

Die Mitarbeit des DIN beim Europäischen Komitee für Normung (CEN) wird für das CEN/TC 302 „Milch und Milchprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ (Sekretariat: NEN, Niederlande) über den DIN-Arbeitsausschuss „Milch und Milchprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

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

ISO 707 siehe DIN EN ISO 707

ISO 8261 siehe DIN EN ISO 8261

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 8261, *Milch und Milchprodukte — Allgemeiner Leitfaden für die Vorbereitung von Untersuchungsproben und die Herstellung von Anschüttelungen und Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen*

Deutsche Fassung

Milch und Milcherzeugnisse —
Nachweis von *Salmonella* spp.
(ISO 6785:2001)

Milk and milk products —
Detection of *Salmonella* spp.
(ISO 6785:2001)

Lait et produits laitiers —
Recherche de *Salmonella* spp.
(ISO 6785:2001)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 19. Mai 2007 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN 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, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, 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
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Kurzbeschreibung	4
4.1 Allgemeines	4
4.2 Voranreicherung in einem nicht selektiven, flüssigen Medium	4
4.3 Anreicherung in selektiven, flüssigen Medien	4
4.4 Ausstreichen und Identifizieren	5
4.5 Bestätigung	5
5 Kulturmedien, Chemikalien und Seren	5
5.1 Wasser	5
5.2 Kulturmedien	5
5.3 Chemikalien	13
5.4 Seren	16
6 Geräte und Glasgeräte	16
7 Probenahme	17
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	17
9 Durchführung	17
9.1 Sicherheitsvorkehrungen	17
9.2 Untersuchungsprobe und Voranreicherung	17
9.3 Anreicherung	18
9.4 Ausstreichen und Identifikation	19
9.5 Bestätigung	19
10 Kontrollkulturen	23
11 Auswertung der Ergebnisse	23
12 Sicherheitsvorkehrungen	23
13 Untersuchungsbericht	24
Anhang A (normativ) Fließschema der Untersuchung	25
Anhang B (normativ) Spezifizierung von Brilliantgrün	26
Anhang C (informativ) Standardverfahren für das Ausstreichen der Agarplatten	27
Literaturhinweise	28

Vorwort

Der Text von ISO 6785:2001 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Agricultural food products“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 6785:2007 durch das Technische Komitee CEN/TC 302 „Milch und Milchprodukte — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ übernommen, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Dezember 2007, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2007 zurückgezogen werden.

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 6785:2001 wurde vom CEN als EN ISO 6785:2007 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. in Milch und Milchzeugnissen fest.

2 Normative Verweisungen

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

ISO 8261|IDF 122, *Milk and milk products — General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Salmonellen

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

3.2

Nachweis von Salmonellen

Nachweis der Anwesenheit oder Abwesenheit dieser Mikroorganismen in einer vorgegebenen Menge oder einem Volumen bei der Untersuchung nach dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

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

4.2 Voranreicherung in einem nicht selektiven, flüssigen Medium

Beimpfung des Voranreicherungsmediums mit der Untersuchungsmenge (Einwaage) und Bebrüten bei 37 °C für 16 h bis 20 h.

4.3 Anreicherung in selektiven, flüssigen Medien

Beimpfung des modifizierten Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Mediums nach Rappaport-Vassiliadis und des Selenit-Cystin-Mediums mit den nach 4.2 erhaltenen Kulturen.

Bebrüten des modifizierten Magnesiumchlorid-Malachitgrün-Mediums nach Rappaport-Vassiliadis in dem auf 41,5 °C eingestellten Wasserbad oder dem Inkubator (6.4) für 24 h und dann für weitere 24 h.

Bebrüten des Selenit-Cystin-Mediums in dem auf 37 °C eingestellten Inkubator (6.3) für 24 h und dann für weitere 24 h.

4.4 Ausstreichen und Identifizieren

Zwei feste Selektivmedien (Brilliantgrün-Phenolrot-Agar und ein anderes geeignetes festes, selektives Medium) werden mit den nach 4.3 erhaltenen Kulturen beimpft.

ANMERKUNG Geeignete Medien ermöglichen die Wiederfindung von laktose-fermentierten Salmonellen-Arten.

Bebrüten des Brilliantgrün-Phenolrot-Agars in dem auf 37 °C eingestellten Inkubator (6.3) und nach 20 h bis 24 h, und falls notwendig, nochmals nach 40 h bis 48 h, wird die Anwesenheit von Kolonien überprüft, die nach ihren Merkmalen für präsumtive Salmonellen gehalten werden können.

Bebrüten des zweiten festen Selektivmediums bei der geeigneten Temperatur, und nach der geeigneten Zeit wird die Anwesenheit von Kolonien überprüft, die nach ihren Merkmalen für präsumtive Salmonellen gehalten werden können.

4.5 Bestätigung

Subkultivierung der präsumtiven Salmonellenkulturen (4.4) und Bestätigung mit geeigneten biochemischen und serologischen Untersuchungen.

5 Kulturmedien, Chemikalien und Seren

Um die Vergleichpräzision der Ergebnisse zu verbessern, wird empfohlen, für die Herstellung der Kulturmedien wasserfreie Grundbestandteile oder wasserfreie Komplettmedien zu verwenden. In diesem Fall ist den Anweisungen des Herstellers genau zu folgen.

Wenn nicht anders angegeben, sind nur analysenreine Chemikalien zu verwenden.

Der pH-Wert bezieht sich auf eine Temperatur von 25 °C. Wenn notwendig, werden Einstellungen durch Zugabe entweder von Salzsäure [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$] oder von Natriumhydroxid-Lösung [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$] vorgenommen.

Die hergestellten Kulturmedien und Chemikalien sind, falls sie nicht gleich verwendet werden und wenn nicht anders angeführt, unter Bedingungen, die keine Veränderungen in ihrer Zusammensetzung verursachen — in Dunkelheit und bei einer Temperatur zwischen 0 °C und +5 °C, für nicht länger als einen Monat zu lagern.

5.1 Wasser

Es wird destilliertes oder demineralisiertes Wasser oder Wasser von gleicher Reinheit verwendet. Das Wasser muss frei sein von Substanzen, die das Wachstum von Mikroorganismen unter den in dieser Internationalen Norm festgelegten Prüfbedingungen hemmen können.

5.2 Kulturmedien

5.2.1 Voranreicherungsmedium: Gepuffertes Peptonwasser

5.2.1.1 Zusammensetzung

Pepton	10,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodekahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$)	9,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	1,5 g
Wasser	1 000 ml

5.2.1.2 Herstellung

Die Bestandteile werden durch Erhitzen in Wasser gelöst. Der pH-Wert wird so eingestellt, dass er nach dem Sterilisieren $7,0 \pm 0,1$ beträgt.

Das Medium wird in Mengen von 225 ml in Kulturkolben (6.9) mit einem Fassungsvermögen von 500 ml (oder einem Mehrfachen von 225 ml in Kolben mit geeignetem Fassungsvermögen) überführt. Die Kolben werden 15 min in dem auf 121 °C eingestellten Autoklaven (6.1) sterilisiert. Es wird auf Raumtemperatur abgekühlt.

5.2 Erstes selektives Anreicherungsmedium: Magnesiumchlorid-Malachidgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis (RVS-Bouillon)

5.2.2.1 Lösung A

5.2.2.1.1 Zusammensetzung

Soja, enzymatisch verdaut	5,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	8,0 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	1,4 g
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	0,2 g
Wasser	1 000 ml

5.2.2.1.2 Herstellung

Die Bestandteile werden in Wasser durch Erwärmen auf etwa 70 °C gelöst. Die Lösung wird am Tag der Herstellung des vollständigen RVS-Mediums angesetzt.

5.2.2.2 Lösung B

5.2.2.2.1 Zusammensetzung

Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	400,0 g
Wasser	1 000 ml

5.2.2.2.2 Herstellung

Das Magnesiumchlorid wird in Wasser gelöst. Da dieses Salz sehr hygroskopisch ist, empfiehlt es sich, den gesamten Inhalt des neu geöffneten Behälters mit $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ im entsprechenden Verhältnis mit Wasser zu lösen. Zum Beispiel werden 250 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ zu 625 ml Wasser gegeben, wodurch sich eine Lösung mit einem Gesamtvolumen von 795 ml und einer Konzentration von etwa 0,3 g/ml $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ergibt.

Lösung B kann in einer luftdichten, braunen Glasflasche bei Raumtemperatur für mindestens 2 Jahre aufbewahrt werden.

5.2.2.3 Lösung C

5.2.2.3.1 Zusammensetzung

Malachitgrün-Oxalat	0,4 g
Wasser	100 ml

5.2.2.3.2 Herstellung

Das Malachitgrün-Oxalat wird in Wasser gelöst.

Lösung C kann in einer braunen Glasflasche bei Raumtemperatur für mindestens 8 Monate aufbewahrt werden.

5.2.2.4 Vollständiges Medium

5.2.2.4.1 Zusammensetzung

Lösung A (5.2.2.1)	1 000 ml
Lösung B (5.2.2.2)	100 ml
Lösung C (5.2.2.3)	10 ml

5.2.2.4.2 Herstellung

Zu 1 000 ml der Lösung A werden 100 ml der Lösung B und 10 ml der Lösung C gegeben. Der pH-Wert wird, falls erforderlich, so eingestellt, dass er nach dem Sterilisieren $5,2 \pm 0,1$ beträgt. 10-ml-Mengen der so erhaltenen Lösung werden in Kulturröhrchen (6.9) oder in sterile Kulturkolben (6.8) mit geeignetem Fassungsvermögen verteilt, um die für die Untersuchung notwendigen Portionen zu erhalten. Diese werden 15 min in dem auf 115 °C eingestellten Autoklaven (6.1) sterilisiert.

Das hergestellte Medium wird im Kühlschrank bei (3 ± 2) °C aufbewahrt.

5.2.3 Zweites selektives Anreicherungsmedium: Selenit-Cystin-Medium

WARNUNG — Größte Sorgfalt ist bei der Laboranwendung von Selenit-Lösungen wegen ihrer möglichen toxischen Wirkung anzuwenden. Unter keinen Umständen dürfen die Pipetten mit dem Mund angesaugt werden.

5.2.3.1 Grundmedium

5.2.3.1.1 Zusammensetzung

Trypton	5,0 g
Lactose	4,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$)	10,0 g
Natriumhydrogenselenit	4,0 g
Wasser	1 000 ml