

DIN EN 17710



ICS 65.080

Entwurf

Einsprüche bis 2023-05-31
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17710:2022-07

**Pflanzen-Biostimulanzien –
Nachweis von *Listeria monocytogenes*;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17710:2023**

Plant biostimulants –
Detection of *Listeria monocytogenes*;
German and English version prEN 17710:2023

Biostimulants des végétaux –
Détection de *Listeria monocytogenes*;
Version allemande et anglaise prEN 17710:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-03-31 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 68 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17710:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-03-06 AA „Pflanzen-Biostimulanzien“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

Änderungen

Gegenüber DIN CEN/TS 17710:2022-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Änderung der Veröffentlichungsform von einer Technischen Spezifikation zu einer Europäischen Norm;
- b) Ergänzung des informativen Anhangs C mit Ringversuchsdaten zur Wiederhol- und Vergleichpräzision des Verfahrens;
- c) Ergänzung des informativen Anhangs ZA zum Zusammenhang mit der Verordnung für EU-Düngeprodukte.

Pflanzen-Biostimulanzien – Nachweis von *Listeria monocytogenes*

Plant biostimulants – Detection of *Listeria monocytogenes*

Biostimulants des végétaux – Détection de *Listeria monocytogenes*

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	9
4.1 Allgemeines	9
4.2 Voranreicherung in selektivem flüssigem Medium	9
4.3 Anreicherung in/auf Selektivmedien	9
4.4 Ausplattieren auf festen Selektivmedien	9
4.5 Bestätigung	9
5 Nährmedien, Reagenzien, Antiseren	10
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien	10
7 Probenahme	10
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	10
9 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	11
9.1 Prüfmenge und Erstverdünnung	11
9.1.1 Allgemeines	11
9.1.2 Flüssigkeit – wasserbasierte Formulierungen	11
9.1.3 Flüssigkeit – ölbasierte Formulierungen (emulgierbares Konzentrat – EC)	11
9.1.4 Feststoff – als wasserdispergierbares Pulver (WP, en: wettable powder) formuliert	11
9.1.5 Feststoff – als wasserdispergierbares Granulat (WDG) formuliert	11
9.1.6 Feststoff – als Pellets, Granulat, Mikrogranulat (langsame Freisetzung) formuliert	12
9.1.7 Feste Substrate	12
9.2 Nicht-selektive Voranreicherung	12
9.3 Selektive Anreicherung	12
9.4 Ausplattieren	12
9.4.1 Allgemeines	12
9.4.2 <i>Listerien</i> -Agar nach Ottaviani und Agosti (Abschnitt B.3)	13
9.4.3 Zweites Selektivmedium	13
9.5 Bestätigung von <i>L. monocytogenes</i>	13
9.5.1 Allgemeines	13
9.5.2 Auswahl von Kolonien für die Bestätigung	13
9.5.3 Bestätigungsuntersuchungen für <i>L. monocytogenes</i>	14
9.6 Bewertung der morphologischen und physiologischen Eigenschaften und der biochemischen Reaktionen	16
9.7 Zusätzliche Charakterisierung isolierter Stämme (optional)	17
10 Angabe der Ergebnisse	17
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens	17
11.1 Ringversuche	17
11.2 Empfindlichkeit	17
11.3 Spezifität	17
11.4 Positiver Vorhersagewert (PPV, en: positive predictive value)	17
11.5 Negativer Vorhersagewert (NPV, en: negative predictive value)	17
12 Untersuchungsbericht	17
13 Qualitätssicherung	18
Anhang A (normativ) Verfahrensschema	19
Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien und Reagenzien	20
B.1 Erstes selektives Anreicherungsmedium: Halb-Fraser-Bouillon	20
B.1.1 Grundmedium	20
B.1.2 Lithiumchloridlösung	20

B.1.3	Nalidixinsäure-Natriumsalz-Lösung	21
B.1.4	Acriflavin-Hydrochlorid-Lösung	21
B.1.5	Ammonium Eisen(III)-citrat-Lösung	21
B.1.6	Vollständiges Medium	21
B.2	Zweites selektives Anreicherungsmedium: Fraser-Bouillon	22
B.2.1	Grundmedium	22
B.2.2	Acriflavin-Hydrochlorid-Lösung	22
B.2.3	Ammonium Eisen(III)-citrat-Lösung	22
B.2.4	Vollständiges Medium	22
B.3	Listerien-Agar nach Ottaviani und Agosti (ALOA)	23
B.3.1	Grundmedium	23
B.3.2	Nalidixinsäurelösung	23
B.3.3	Ceftazidimlösung	23
B.3.4	Polymyxin-B-Lösung	24
B.3.5	Antibiotika-Supplement	24
B.3.6	Supplement	25
B.3.7	Vollständiges Medium	25
B.4	Zweites festes Selektivmedium	25
B.5	Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien	25
B.6	Wasserstoffperoxidlösung	26
B.7	Beweglichkeitsagar	26
B.7.1	Zusammensetzung	26
B.7.2	Herstellung	26
B.8	Blutagar	26
B.8.1	Grundmedium	26
B.8.2	Defibriniertes Blut (Schaf, Kalb oder Rind)	27
B.8.3	Vollständiges Medium	27
B.9	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS; en: Phosphate-buffered saline)	27
B.9.1	Zusammensetzung	27
B.9.2	Herstellung	27
B.10	Suspension von roten Blutkörperchen	27
B.11	CAMP-Medium (Christie, Atkins, Munch-Petersen) und Prüfstämme	28
B.11.1	Allgemeines	28
B.11.2	Grundmedium	28
B.11.3	Blutmedium	28
B.11.4	Vollständiges Medium	28
B.12	Kohlenhydrat-Bouillon (L-Rhamnose und D-Xylose)	28
B.12.1	Grundmedium	28
B.12.2	Kohlenhydratlösungen	28
B.12.3	Vollständiges Medium	29
B.13	Trypton-Soja-Hefeextraktagar (TSYEA)	29
B.13.1	Zusammensetzung	29
B.13.2	Herstellung	29
Anhang C (informativ)	Ergebnisse des Ringversuchs zum Nachweis von <i>Listeria monocytogenes</i>	30
C.1	Ergebnisse des Ringversuchs	30
C.2	Statistische Analyse	30
Anhang ZA (informativ)	Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der abzudeckenden Verordnung (EU) 2019/1009 zur Bereitstellung von EU-Düngeprodukten auf dem Markt	32
Literaturhinweise		33

Bilder

Bild A.1 — Fließschema des Nachweisverfahrens für <i>Listeria monocytogenes</i> in Proben von mikrobiellen Pflanzen-Biostimulanzien und aus dem Bereich der mikrobiellen Produktion	19
---	----

Tabellen

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien	6
Tabelle 2 — Bestätigungsuntersuchungen für <i>L. monocytogenes</i>	14
Tabelle C.1 — Ergebnisse der Datenanalyse nach Untersuchung von handelsüblichen Biostimulanzien	30
Tabelle C.2 — Kontingenztafel	31
Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Verordnung (EU) 2019/1009	32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17710:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird CEN/TS 17710:2022 ersetzen.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinie(n)/Verordnung(en).

Zum Zusammenhang mit EU-Richtlinie(n)/Verordnung(en) siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokuments ist.

Einleitung

Dieses Dokument wurde von den Experten des CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ erarbeitet. Das Europäische Komitee für Normung (CEN) wurde von der Europäischen Kommission (EC) beauftragt, Europäische Normen bzw. europäische Normungsergebnisse zu verfassen, die der Umsetzung der Verordnung (EU) 2019/1009 vom 5. Juni 2019 mit Vorschriften für die Bereitstellung von EU-Düngeprodukten auf dem Markt („Düngeprodukteverordnung“) dienen sollen.

Dieser Normungsauftrag, vorgestellt als SRM/564 und M/564/Amd1, ist auch ein Beitrag zur Strategie „Innovating for Sustainable Growth: A Bio economy for Europe“. Im Rahmen dieses Auftrags wurde die Arbeitsgruppe 5 „Kennzeichnung und Bezeichnungen“ (en: Labelling and denominations) gebildet, um ein Arbeitsprogramm zu entwickeln. Das Technische Komitee CEN/TC 455 „Pflanzen-Biostimulanzien“ wurde eingerichtet, um dieses Arbeitsprogramm auszuführen, wobei eine Normenreihe erarbeitet wird. Das Interesse an Biostimulanzien als wertvolles Hilfsmittel für die Landwirtschaft ist in Europa deutlich gestiegen. Es wurde erkannt, dass der Normung eine wichtige Rolle zukommt, wenn es darum geht, den Einsatz von Pflanzen-Biostimulanzien zu fördern. Die Arbeit des CEN/TC 455 ist darauf ausgerichtet, die Zuverlässigkeit der Lieferkette zu verbessern und so das Vertrauen von Landwirten, Industrie und Verbrauchern in Pflanzen-Biostimulanzien zu stärken, und wird die Kommerzialisierung der europäischen Biostimulanzienindustrie fördern und unterstützen.

Biostimulanzien, die in der Landwirtschaft eingesetzt werden, können auf vielfältige Weise angewendet werden: auf dem Boden, auf der Pflanze, als Samenbehandlung usw. Ein mikrobielles Pflanzen-Biostimulans besteht aus einem Mikroorganismus oder einem Konsortium von Mikroorganismen, wie in der Komponentenmaterialkategorie 7 des Anhangs II der EU-Düngeprodukteverordnung angegeben.

Dieses Dokument ist für alle mikrobiellen Biostimulanzien in der Landwirtschaft anwendbar.

Tabelle 1 fasst viele der agrarökologischen Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien zusammen.

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien

Erhöhung der Biodiversität
durch Verbesserung der Qualität/Quantität der Mikroorganismen im Boden
Stärkung biologischer Regulationen und Wechselwirkungen
durch Verstärkung der Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen
— symbiotischer Austausch, d. h. <i>Mykorrhizae</i>
— symbiotischer Austausch, d. h. <i>Rhizobiaceae/Fabaceae</i>
— Sekrete, die Pflanzenhormone nachahmen (d. h. <i>Trichoderma</i>)
durch Regulierung pflanzenphysiologischer Prozesse
— zum Beispiel Wachstum, Stoffwechsel, Pflanzenentwicklung ...
Verbesserung der biogeochemischen Kreisläufe
— Verbesserung der Aufnahme von als Nährstoff dienenden Elementen
— Verbesserung der Bioverfügbarkeit von als Nährstoff dienenden Elementen im Boden
— Stimulierung des Abbaus organischer Substanz

WARNUNG — Personen, die dieses Dokument anwenden, sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, alle gegebenenfalls zutreffenden Sicherheitsprobleme im Zusammenhang mit seiner Anwendung zu behandeln. Es liegt in der Verantwortung des

Anwenders, geeignete Vorsichtsmaßnahmen für den Arbeits- und Gesundheitsschutz zu treffen und die Einhaltung nationaler Vorschriften sicherzustellen.

WICHTIG — Es ist unerlässlich, dass nach diesem Dokument durchgeführte Prüfungen von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument enthält ein Verfahren zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* in mikrobiellen Pflanzen-Biostimulanzien, um zu verifizieren, dass der Gehalt dieses Humanpathogens die entsprechenden Grenzwerte der EU-Düngeprodukteverordnung[1] einhält.

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).

prEN 17724:—¹, *Pflanzen-Biostimulanzien — Terminologie*

prEN 17708:—¹, *Pflanzen-Biostimulanzien — Probenvorbereitung für die mikrobielle Analyse*

EN ISO 11290-1:2017, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von *Listeria monocytogenes* und von *Listeria* spp. — Teil 1: Nachweisverfahren (ISO 11290-1:2017)*

EN ISO 11133:2014,¹ *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

EN ISO 7218:2007, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 7218:2007)*

EN ISO 6887-1:2017, *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)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach prEN 17724:—² und die folgenden Begriffe.

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

— IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

3.1

Listeria monocytogenes

Bakterium, das auf dem angegebenen Selektivmedium nach 24 h Bebrütung bei einer Temperatur von 37 °C unter aeroben Bedingungen Kolonien bildet, die der Beschreibung der Art entsprechen

Anmerkung 1 zum Begriff: *L. monocytogenes* ist ein grampositives, nicht sporenbildendes, stäbchenförmiges Bakterium, das zur Gattung *Listeria*, Phylum Firmicutes, gehört.

Anmerkung 2 zum Begriff: *L. monocytogenes* ist ein allgegenwärtiger bakterieller Krankheitserreger, der schwerwiegende lokalisierte und generalisierte Infektionen beim Menschen hervorruft.

¹ Geändert durch EN ISO 11133:2014/A1:2018 und EN ISO 11133:2014/A2:2020.

² In Vorbereitung.

Anmerkung 3 zum Begriff: *L. monocytogenes* sind katalasepositiv und oxidasenegativ. Wenn sie bei einer Temperatur zwischen 20 °C und 25 °C kultiviert werden, bilden sie Flagellen, jedoch nicht bei 37 °C. Auf Blutagarplatten bilden sie ein β -Hämolyisin, was sich durch den CAMP-Diagnostest (Test nach Christie, Atkins, Munch-Petersen) nachweisen lässt.

Anmerkung 4 zum Begriff: *L. monocytogenes* können sich bei Temperaturen zwischen –0,4 °C und 50 °C vermehren; die Optimaltemperatur liegt zwischen 30 °C und 37 °C. Sie können Frost widerstehen, doch durch Erhitzen bei 60 °C für 30 min werden sie inaktiviert.

Anmerkung 5 zum Begriff: *L. monocytogenes* sind fakultative Anaerobier, die unter aeroben Bedingungen Glucose, Lactose und Rhamnose verwerten und unter anaeroben Bedingungen verschiedene Hexosen und Pentosen vergären können.

Anmerkung 6 zum Begriff: *L. monocytogenes* können sich im pH-Bereich von 4 bis 9,5 und bei einer Wasseraktivität von 0,90 bis 0,97 vermehren. Sie können sich auch in 10 % Natriumchlorid vermehren.

[QUELLE: EN ISO 11290-1:2017, 3.1]

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Für den Nachweis von *Listeria monocytogenes* sind vier aufeinanderfolgende Verfahrensschritte erforderlich, wie in Anhang A angegeben.

ANMERKUNG *L. monocytogenes* kann in geringer Zahl vorhanden sein und kommt häufig gemeinsam mit einer beträchtlich größeren Anzahl von Bakterien vor, die zu anderen taxonomischen Gruppen oder anderen *Listerien*arten gehören. Um den Nachweis einer geringen Anzahl von *L. monocytogenes* oder von geschädigten *L. monocytogenes* zu ermöglichen, erfolgt eine Voranreicherung.

4.2 Voranreicherung in selektivem flüssigem Medium

Die Halb-Fraser-Bouillon (225 ml) bei Raumtemperatur wird mit der Prüfmenge (25 g oder 25 ml) beimpft und anschließend 24 h bis 26 h bei 30 °C $\pm$ 1 °C bebrütet.

Bei großen Mengen (z. B. 1 l oder mehr) empfiehlt es sich, die Bouillon auf 30 °C aufzuwärmen, bevor sie mit der Prüfmenge vermischt wird.

4.3 Anreicherung in/auf Selektivmedien

Die Fraser-Bouillon wird bei 37 °C beimpft (0,1 ml der Kultur in 10 ml Fraser-Bouillon) und 24 h $\pm$ 2 h bei 37 °C $\pm$ 1 °C bebrütet.

4.4 Ausplattieren auf festen Selektivmedien

Primäre UND sekundäre Anreicherungen werden ausgestrichen auf:

- *Listerien*-Agar nach Ottaviani und Agosti (ALOA)[3];
- einen zweiten Selektivagar nach Wahl, z. B. PALCAM-Agar, Oxford-Agar.

Der *Listerien*-Agar nach Ottaviani und Agosti wird 24 h $\pm$ 2 h bei 37 °C $\pm$ 1 °C und zusätzlich 24 h $\pm$ 2 h bei 37 °C $\pm$ 1 °C bebrütet und anschließend untersucht. Der zweite Selektivagar wird nach den Angaben des Herstellers bebrütet.

4.5 Bestätigung

Kolonien von präsumtiven *L. monocytogenes* werden subkultiviert, und ihre Identität wird durch geeignete morphologische und biochemische Untersuchungen bestätigt.

5 Nährmedien, Reagenzien, Antiseren

Zur üblichen Laborpraxis sind prEN 17708:—² und EN ISO 11133:2014¹ zu verwenden.

Die 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.

Es muss die übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Labors nach EN ISO 7218:2007 verwendet werden, und insbesondere Folgendes:

6.1 Gerät für die Trockensterilisation (Heißluft-Sterilisator) und Dampfsterilisation (Autoklav), wie in EN ISO 7218:2007 angegeben.

6.2 Trocken- oder Brutschrank, in einem Bereich zwischen 25 °C und 50 °C betriebsfähig.

6.3 Brutschränke, auf 30 °C ± 1 °C, 37 °C ± 1 °C und 25 °C ± 1 °C (optional) einstellbar.

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

6.5 Sterile Impfösen, mit einem Durchmesser von ungefähr 3 mm oder 10 µl Volumen, sowie Impfnadel oder Impfdraht.

6.6 pH-Messgerät mit einer Fehlergrenze der Kalibrierung von ±0,1 pH-Einheiten bei 25 °C.

6.7 Sterile Messpipetten oder automatische Pipetten, mit 1 ml und 10 ml Nennvolumen.

6.8 Sterile Petrischalen, mit einem Durchmesser von ungefähr 90 mm und (optional) großer Ausführung (Durchmesser ungefähr 140 mm).

6.9 Mikroskop, vorzugsweise Phasenkontrastmikroskop, mit Objektträgern und Deckgläsern.

6.10 Kühlschrank, betriebsfähig bei 5 °C ± 3 °C.

6.11 Peristaltischer Mischer (Stomacher) mit sterilen 400-ml-Beuteln.

6.12 Mischermotor und Behälter oder Vortex-Mischer.

7 Probenahme

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

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 aus der Laborprobe wird nach der spezifischen Internationalen oder Europäischen Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst, und nach EN ISO 6887-1:2017 vorbereitet.

9 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

9.1 Prüfmenge und Erstverdünnung

9.1.1 Allgemeines

Um eine tatsächlich repräsentative Analyseeinheit sicherzustellen, werden Flüssigkeiten oder frei fließende Materialien bewegt, bis sie homogen sind. Handelt es sich bei der Probeneinheit um einen Feststoff, wird die Analyseeinheit erstellt, indem an mehreren Stellen innerhalb der Probeneinheit ein Anteil entnommen wird. Um den Arbeitsaufwand zu reduzieren, dürfen die Analyseeinheiten für die Analyse zusammengefasst werden. Es wird empfohlen, dass eine Sammelprobe nicht mehr als fünf Analyseeinheiten enthält.

Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen sind in prEN 17708:—² beschrieben. Die Erstverdünnung der Proben der mikrobiellen Biostimulanzienprodukte kann nach EN ISO 11290-1:2017 hergestellt werden, wobei als Verdünnungsflüssigkeit das in Abschnitt B.1 beschriebene erste selektive Anreicherungsmedium, eine Halb-Fraser-Bouillon, verwendet wird.

Eine repräsentative Probe des Produkts sollte unter Berücksichtigung der verschiedenen Formulierungen von Produkten auf Basis von Biostimulanzien hergestellt werden.

25 g oder 25 ml des Produkts (die Analyseeinheit) werden zu 225 ml Halb-Fraser-Bouillon in einem 400-ml-Stomacher-Beutel (6.11) oder einem Mixerbehälter (6.12) hinzugefügt. Bei Sammelproben dürfen Analyseeinheiten bis zu 125 g oder ml kombiniert werden (z. B. 125 g oder ml Lebensmittel zu 1 125 ml Halb-Fraser-Bouillon). Vor dem Gebrauch wird die Halb-Fraser-Bouillon auf Raumtemperatur vorgewärmt.

Wenn alternative Analyseeinheiten erforderlich sind, ist ein Verhältnis von 1 Teil Probenmaterial zu 9 Teilen Halb-Fraser-Bouillon einzuhalten.

Um die Auswirkungen der Probenahme auf die Signifikanz und die Zuverlässigkeit der Analyseergebnisse möglichst gering zu halten, sollte die Anzahl der untersuchten Parallelproben auf 5 erhöht werden.

9.1.2 Flüssigkeit – wasserbasierte Formulierungen

25 ml des Produkts (die Analyseeinheit) werden aseptisch zu 225 ml Halb-Fraser-Bouillon in einem sterilen 400-ml-Stomacher-Beutel (6.11) oder einem Mixerbehälter (6.12) hinzugefügt. Vor dem Gebrauch wird die Halb-Fraser-Bouillon auf Raumtemperatur vorgewärmt. Für eine gründliche Durchmischung wird je nach Bedarf ein Mixer, ein Stomacher oder ein Vortex-Mischer eingesetzt.

9.1.3 Flüssigkeit – ölbasierte Formulierungen (emulgierbares Konzentrat – EC)

25 g des Produkts (die Analyseeinheit) werden aseptisch zu 225 ml Halb-Fraser-Bouillon in einem sterilen 400-ml-Stomacher-Beutel (6.11) oder einem Mixerbehälter (6.12) hinzugefügt. Vor dem Gebrauch wird die Halb-Fraser-Bouillon auf Raumtemperatur vorgewärmt. Für eine gründliche Durchmischung wird je nach Bedarf ein Mixer, ein Stomacher oder ein Vortex-Mischer eingesetzt.

9.1.4 Feststoff – als wasserdispergierbares Pulver (WP, en: wettable powder) formuliert

25 g des Produkts (die Analyseeinheit) werden aseptisch zu 225 ml Halb-Fraser-Bouillon in einem sterilen 400-ml-Stomacher-Beutel (6.11) hinzugefügt. Vor dem Gebrauch wird die Halb-Fraser-Bouillon auf Raumtemperatur vorgewärmt. Die Mischung wird 2 min lang bei höherer Geschwindigkeit mit einem Stomacher (6.11) homogenisiert.

9.1.5 Feststoff – als wasserdispergierbares Granulat (WDG) formuliert

25 g des Produkts (die Analyseeinheit) werden aseptisch zu 225 ml Halb-Fraser-Bouillon in einem sterilen 400-ml-Stomacher-Beutel (6.11) hinzugefügt. Vor dem Gebrauch wird die Halb-Fraser-Bouillon auf Raumtemperatur vorgewärmt. Die Mischung wird 2 min lang bei höherer Geschwindigkeit mit einem Stomacher (6.11) homogenisiert.

9.1.6 Feststoff – als Pellets, Granulat, Mikrogranulat (langsame Freisetzung) formuliert

25 g des Produkts (die Analyseeinheit) werden aseptisch zu 225 ml Halb-Fraser-Bouillon in einem sterilen 400-ml-Stomacher-Beutel (6.11) hinzugefügt. Vor dem Gebrauch wird die Halb-Fraser-Bouillon auf Raumtemperatur vorgewärmt. Die Mischung wird 2 min lang bei höherer Geschwindigkeit mit einem Stomacher (6.11) homogenisiert.

9.1.7 Feste Substrate

25 g des Produkts (die Analyseeinheit) werden aseptisch zu 225 ml Halb-Fraser-Bouillon in einem sterilen 400-ml-Stomacher-Beutel (6.11) hinzugefügt. Vor dem Gebrauch wird die Halb-Fraser-Bouillon auf Raumtemperatur vorgewärmt. Die Mischung wird 2 min lang bei höherer Geschwindigkeit mit einem Stomacher (6.11) homogenisiert.

9.2 Nicht-selektive Voranreicherung

Die Prüfmenge (25 g oder 25 ml) wird in Halb-Fraser-Bouillon (225 ml) vorbereitet. Es wird 24 h bis 26 h bei 30 °C bebrütet.

ANMERKUNG 1 Während der Bebrütung kann eine schwarze Verfärbung eintreten.

ANMERKUNG 2 Nach der Bebrütung kann die vorangereicherte Probe vor dem Einbringen in die Fraser-Bouillon für eine Höchstdauer von 72 h bei 5 °C (6.10) gelagert werden.

9.3 Selektive Anreicherung

9.3.1 Nachdem die Erstverdünnung (erste Anreicherung in Halb-Fraser-Bouillon) 24 h bis 26 h (9.2) bebrütet wurde, werden 0,1 ml der in 9.2 erhaltenen Kultur in ein Kulturröhrchen oder eine Flasche mit 10 ml zweitem Anreicherungsmedium (Fraser-Bouillon) (beschrieben in Abschnitt B.2) überführt.

9.3.2 Das beimpfte Medium (9.3.1) wird 24 h ± 2 h bei 37 °C (6.3) bebrütet.

Die Halb-Fraser-Bouillon und die Fraser-Bouillon dürfen vor der Überführung oder der Isolierung auf dem Selektivagar für eine Höchstdauer von 72 h gekühlt gelagert werden. Die Kühlung sorgt für eine höhere Produktivität des Labors und analytische Flexibilität. Nach der Kühlzeit wird die Sekundär-Anreicherungsbouillon vor der Überführung oder dem Ausplattieren auf Agar-Medien resuspendiert.

9.4 Ausplattieren

9.4.1 Allgemeines

9.4.1.1 Von der ersten Anreicherungskultur (9.2), die für 25 h ± 1 h bei 30 °C (6.3) bebrütet wurde, wird mit einer Öse (6.5) die Oberfläche des ersten festen Selektivmediums, *Listerien*-Agar nach Ottaviani und Agosti (ALOA) (beschrieben in Abschnitt B.3), so beimpft, dass gut voneinander abgegrenzte Einzelkolonien entstehen.

In derselben Art und Weise wird das zweite gewählte feste Selektivmedium (Abschnitt B.4) beimpft.

ANMERKUNG Die Halb-Fraser-Bouillon und die Fraser-Bouillon können vor dem Ausplattieren (der Isolierung) auf dem Selektivagar für eine Höchstdauer von 72 h bei 5 °C (6.10) gekühlt gelagert werden[4].

9.4.1.2 Mit dem zweiten Anreicherungsmedium, das für 24 h ± 2 h bei 37 °C (6.3) bebrütet wurde (9.3.2), wird das in 9.4.1.1 beschriebene Verfahren mit den beiden festen Selektivmedien wiederholt.

9.4.1.3 Die in 9.4.1.1 und 9.4.1.2 erhaltenen Petrischalen werden mit dem Deckel nach unten in einen Brutschrank gestellt, der für den *Listerien*-Agar nach Ottaviani und Agosti (Abschnitt B.3) auf 37 °C (6.3) eingestellt ist. Das zweite Selektivmedium (Abschnitt B.4) wird nach den Anweisungen des Herstellers bebrütet.

9.4.1.4 Der *Listerien*-Agar nach Ottaviani und Agosti (Abschnitt B.3) wird insgesamt $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ bebrütet. Wenn Kolonien von präsuntiven *L. monocytogenes* nach $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ erkennbar sind, darf die Bebrütung zu diesem Zeitpunkt beendet werden. Der zweite Selektivagar wird eine geeignete Dauer bebrütet. Die Platten (9.4.1.3) werden auf die Anwesenheit präsuntiver *L. monocytogenes*-Kolonien untersucht.

ANMERKUNG Bebrütete Platten können vor der Untersuchung für eine Höchstdauer von 48 h bei 5 °C (6.10) gekühlt gelagert werden.

9.4.2 *Listerien*-Agar nach Ottaviani und Agosti (Abschnitt B.3)

Als präsuntive *L. monocytogenes* werden die von einem opaken Hof umgebenen blaugrünen Kolonien (typische Kolonien) angesehen. Kolonien von *Listeria ivanovii* sind ebenfalls blaugrün und von einem opaken Hof umgeben.

ANMERKUNG 1 Einige Stämme von *L. monocytogenes*, die Stressbedingungen, insbesondere Säurestress, ausgesetzt waren, können einen sehr schwachen Hof (oder sogar keinen Hof) zeigen.

ANMERKUNG 2 Einige seltene *L. monocytogenes* sind durch eine geringe PIPLC-Aktivität (PIPLC: Phosphatidylinositol-Phospholipase C) gekennzeichnet. Derartige Bakterien werden nachgewiesen, wenn die Gesamtdauer der Bebrütung zum Beispiel mehr als vier Tage beträgt. Einige dieser Stämme könnten pathogen sein[5]. Keine Stämme von *L. monocytogenes* wurden als PIPLC-negativ beschrieben.

ANMERKUNG 3 Einige andere Organismen außer *Listeria* spp. können auf diesem Medium[6] blaue Kolonien bilden.

9.4.3 Zweites Selektivmedium

Nach der entsprechenden Zeit werden die Platten auf das Vorhandensein von Kolonien untersucht, die nach ihren charakteristischen Merkmalen präsuntive *L. monocytogenes* sind, je nach Art des verwendeten Mediums (Abschnitt B.4).

9.5 Bestätigung von *L. monocytogenes*

9.5.1 Allgemeines

Bestätigungsuntersuchungen müssen nach der Norm EN ISO 11290-1:2017 durchgeführt werden; seit der jüngsten Überarbeitung und Validierung dieser Norm sind der Katalase-Test und CAMP-Test für *L. monocytogenes* optional. Die Bestätigung anhand des mikroskopischen Aussehens bleibt verpflichtend, wobei ein Agar verwendet wird, der eine Unterscheidung zwischen den verwendeten pathogenen *Listeria* spp. ermöglicht. Für die Untersuchung auf Hämolyse bzw. den CAMP-Test wird der Blutagar nunmehr von defibriniertem Schafsblut um Kalbs- oder Rinderblut erweitert. Für die Untersuchung auf Hämolyse ist Blutagar durch Einstechen oder Ausstreichen (nur bei positivem Ergebnis des Reinigungsschritts) zu beimpfen[2].

Für jede Bestätigungsuntersuchung müssen geeignete positive und negative Kontrollstämmen eingesetzt werden.

9.5.2 Auswahl von Kolonien für die Bestätigung

Zur Bestätigung der präsuntiven *L. monocytogenes* wird mindestens eine Kolonie entnommen, die vermutlich *L. monocytogenes* ist (siehe 9.4.2 und 9.4.3). Ein bestätigtes Isolat je Probe ist ausreichend. Wenn die erste Kolonie negativ ist, werden weitere Kolonien, die vermutlich *L. monocytogenes* sind, aus dem Selektivmedium entnommen (bis zu maximal fünf Kolonien von jeder Platte mit jedem Selektivmedium).

Die ausgewählten Kolonien werden so auf der Oberfläche der vorgetrockneten Platten eines nicht-selektiven Agars, zum Beispiel Blutagar, Nähragar, Trypton-Soja-Hefeextrakt-Agar (TSYEA, en: Tryptone soya yeast extract agar) (Abschnitt B.13), ausgestrichen, dass sich gut voneinander abgegrenzte Einzelkolonien entwickeln können.

Die Verwendung von Blutagar für Reinkulturen ermöglicht bereits in dieser Phase die Auswertung der Hämolyse, sofern diese positiv ist. Zeigt sich beim Ausplattieren auf Blutagar keine Hämolyse, muss die Hämolyseuntersuchung durch Stichkulturen oder in Flüssigmedium erfolgen.

Die Platten werden in dem auf 37 °C (6.3) eingestellten Brutschrank 18 h bis 24 h, oder bis das Wachstum zufriedenstellend ist, bebrütet.

Wenn die Kolonien nicht gut voneinander abgegrenzt gewachsen sind, wird eine für *L. monocytogenes* typische Kolonie entnommen und davon eine Subkultur auf einer weiteren nicht-selektiven Agar-Platte angelegt. Die folgenden Untersuchungen (9.5.3) werden mit einer vom nicht-selektiven Agar entnommenen Reinkultur durchgeführt.

9.5.3 Bestätigungsuntersuchungen für *L. monocytogenes*

9.5.3.1 Allgemeines

Die verbindlichen und die optionalen Untersuchungen, die zur Bestätigung von präsumtiven *L. monocytogenes* durchzuführen sind, sind in EN ISO 11290-1:2017 beschrieben und in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 — Bestätigungsuntersuchungen für *L. monocytogenes*

Untersuchungen	Bestätigungsuntersuchungen für <i>L. monocytogenes</i>	Ergebnisse
Verbindlich	mikroskopisches Aussehen	dünne kurze oder kokkoide Stäbchen
	beta-Hämolyse	+
	L-Rhamnose	+
	D-Xylose	—
Optional	Katalase	+
	Beweglichkeit bei 25 °C	+
	CAMP-Test	+

Ein alternatives Verfahren, wie in EN ISO 7218:2007 aufgeführt, kann zur Bestätigung des Isolats als *Listeria monocytogenes* angewendet werden, vorausgesetzt, die Eignung des alternativen Verfahrens ist verifiziert. Zur biochemischen Identifizierung von *L. monocytogenes* dürfen miniaturisierte Identifizierungssysteme verwendet werden, sofern die Verlässlichkeit der Systeme nachgewiesen ist (siehe EN ISO 7218:2007). Seltene Stämme von *L. monocytogenes* zeigen unter den in diesem Dokument beschriebenen Bedingungen keine beta-Hämolyse oder positive Reaktion im CAMP-Test. Wenn typische Kolonien auf *Listerien*-Agar nach Ottaviani und Agosti mit PIPLC-Aktivität, auch wenn diese nur gering ist, keine Hämolyse zeigen, wird empfohlen, zusätzliche Untersuchungen durchzuführen (z. B. Gramfärbung, Katalase, Beweglichkeit, CAMP-Test, PCR), um festzustellen, ob es sich um ein nicht Hämolyse bildendes Isolat von *L. monocytogenes* handelt.

9.5.3.2 Katalasereaktion (optional)

Eine nach 9.5.2 isolierte Kolonie wird auf einem Objektträger in einem Tropfen Wasserstoffperoxidlösung (Abschnitt B.6) suspendiert. Die sofortige Bildung von Gasblasen zeigt eine positive Reaktion an.

ANMERKUNG Wird die Katalasereaktion bei einer von einem Blutagar stammenden Kolonie durchgeführt, kann dies mitunter zu falsch positiven Ergebnissen führen.

9.5.3.3 Beweglichkeitsprüfung (optional)

Eine nach 9.5.2 isolierte Kolonie wird in einem Röhrchen mit einem nicht-selektiven flüssigen Nährmedium suspendiert.

Das Röhrchen wird 8 h bis 24 h bei 25 °C im Brutschrank (6.3) bebrütet, bis eine Trübung des Mediums beobachtet wird.

Ein Tropfen der bebrüteten Kultur wird mit einer Öse (6.5) auf einen sauberen Objektträger gebracht. Ein Deckglas wird aufgelegt und das Präparat wird mit dem Mikroskop (6.9) untersucht.

L. monocytogenes erscheinen als dünne kurze Stäbchen mit torkelnder Bewegung.

Bei Kulturen, die sich bei Temperaturen oberhalb von 25 °C entwickelt haben, kann diese Bewegung fehlen. Es müssen stets Vergleiche mit einer bekannten *L. monocytogenes*-Kultur angestellt werden. Kokken, große Stäbchen oder Stäbchen mit schneller schwimmender Bewegung sind keine *Listeria* spp.

Als alternative Beweglichkeitsprüfung wird etwas Material einer isolierten Kolonie, die von einem nicht-selektiven Agar erhalten wurde, mit einer Impfnadel (6.5) in sterilisiertem Wasser (oder in einem anderen geeigneten Verdünnungsmittel) verdünnt. *L. monocytogenes* erscheinen als dünne kurze Stäbchen mit torkelnder Bewegung.

Als weitere alternative Beweglichkeitsprüfung wird der Beweglichkeitsagar (Abschnitt B.7) mit einer Kultur, die von einer nach 9.5.2 erhaltenen typischen Kolonie entnommen wurde, mit einer Impfnadel (6.5) beimpft und anschließend 48 h ± 2 h im Brutschrank bei 25 °C bebrütet.

9.5.3.4 Mikroskopisches Aussehen

Mit einer nach 9.5.2 gut isolierten Kolonie wird ein mikroskopisches Präparat (z. B. die Gramfärbung, Nassmikroskopie) angelegt. *L. monocytogenes* sind grampositive (wenn diese Färbung durchgeführt wird), dünne, kurze oder kokkoide Stäbchen, mit torkelnder Bewegung, wenn sie aus einer frischen Kultur stammen.

Für die Durchführung einer Gramfärbung am mikroskopischen Präparat siehe prEN 17708:—².

9.5.3.5 Untersuchungen auf Hämolyse

9.5.3.5.1 Allgemeines

Untersuchungen auf Hämolyse können nach den in EN ISO 11290-1:2017 beschriebenen und nach den in 9.5.3.5.2 und 9.5.3.5.3 angegebenen Verfahren durchgeführt werden. Es wird eine der Untersuchungen auf Hämolyse gewählt (9.5.3.5.2 oder 9.5.3.5.3).

ANMERKUNG Es gibt seltene Stämme von *L. monocytogenes*, die unter den in diesem Dokument beschriebenen Bedingungen keine β-Hämolyse oder positive Reaktion auf den CAMP-Test zeigen.

9.5.3.5.2 Hämolyse auf Blutagar

Wenn die morphologischen und physiologischen Merkmale auf die mögliche Anwesenheit von *Listeria* spp. hindeuten, werden Blutagarplatten zur Untersuchung der Hämolysereaktion beimpft.

Vor der Verwendung wird die Agaroberfläche gut getrocknet. Mit einem Impfdraht (6.5) wird eine in 9.5.2 isolierte Kolonie entnommen und anschließend mit ihr die Oberfläche des Agars durch Einstechen beimpft. Dieser Vorgang wird für jede Kultur wiederholt. Es werden, wenn möglich auf derselben Platte, positive (*L. monocytogenes*) und negative (*L. innocua*) Kontrollkulturen durch Einstich mitgeführt.

Nach 24 h ± 2 h Bebrütung bei 37 °C (6.3) werden die Teststämme und Kontrollen untersucht. *L. monocytogenes* zeigt schmale, klare, helle Hämolysezonen; *L. innocua* zeigt keine klare Zone um den Einstich. Die Platten werden im hellen Licht untersucht, um die Kulturen der Teststämme mit den Kontrollen zu vergleichen.

ANMERKUNG 1 Die Hämolysereaktion ist leichter zu erkennen, wenn Koloniematerial auf der Agaroberfläche um die Beimpfungsstelle herum entfernt wird.

ANMERKUNG 2 Die Untersuchung auf Hämolyse kann durchgeführt werden, indem die für den CAMP-Test verwendete Blutagarplatte zusätzlich durch Einstich beimpft wird.

9.5.3.5.3 Hämolysereaktion mit roten Blutkörperchen

Die Hämolysereaktion darf auch mit roten Blutkörperchen wie folgt durchgeführt werden.

Die Kolonie wird in 150 µl eines nicht-selektiven flüssigen Nährmediums dispergiert und 2 h bei 37 °C (6.3) bebrütet. 150 µl einer Suspension von roten Blutkörperchen (Abschnitt B.10) werden zugefügt. Die Mischung wird für 15 min bis 60 min bei 37 °C (6.3) bebrütet und anschließend etwa 2 h bei 5 °C (6.10) gekühlt. Daraufhin wird auf hämolytische Aktivität geprüft. Wenn die Reaktion zweifelhaft ist, wird die Kultur für bis zu 24 h ± 2 h bei 5 °C (6.10) stehen gelassen. Ein Absetzen roter Blutkörperchen (Bildung eines roten Punktes am Boden der Röhren) deutet auf eine negative Reaktion hin.

Positive und negative Kontrollen werden mitgeführt.

9.5.3.6 CAMP-Test (optional)

Wenn das Ergebnis der Untersuchung auf Hämolyse schwer zu interpretieren ist, wird der CAMP-Test empfohlen, um eindeutig nachzuweisen, dass die Hämolyse auf Listeriolysin-Aktivität zurückzuführen ist. Der CAMP-Test kann wie in EN ISO 11290-1:2017 beschrieben unter Verwendung geeigneter β-hämolytischer Kontrollstämme (siehe EN ISO 11290-1:2017) und der in B.8.3 oder B.11.4 beschriebenen Blutagarplatten durchgeführt werden.

Bei Verwendung von Blutagar (B.8.3) werden die Platten 18 h bis 24 h bei 37 °C bebrütet. Wenn Doppelschichtplatten (B.11.4) verwendet werden, wird 12 h bis 18 h bei 37 °C bebrütet.

L. monocytogenes ist ein CAMP-positiver Organismus, und die Hämolyse durch *L. monocytogenes* wird in der Nähe von *Staphylococcus aureus* verstärkt (siehe EN ISO 11290-1).

9.5.3.7 Kohlenhydratabbau

Mit einer Öse (6.5) wird jede Kohlenhydrat-Bouillon (Abschnitt B.12) mit den von dem nicht-selektiven Agar (9.5.2) erhaltenen Kulturen beimpft. Die Bouillon wird bei 37 °C bebrütet. Positive Reaktionen (Säurebildung) werden durch eine Gelbfärbung angezeigt und treten bei Mikrovolumen-Röhren meist innerhalb von 24 h bis 48 h und bei Makrovolumen-Röhren innerhalb von bis zu 5 Tagen auf. L-Rhamnose und D-Xylose werden zur Bestätigung der L-Rhamnose-positiven und D-Xylose-negativen *L. monocytogenes* verwendet (siehe EN ISO 11290-1:2017, Anhang D).

Das Beimpfungsniveau im Vergleich zum Gesamtvolumen ist ein wichtiger Faktor. Für jede gewählte Verfahrensanweisung ist es wichtig, die Zeit bis zum Erhalt einer gelben Färbung zu verifizieren. Es wird empfohlen, Kontrollkulturen zu verwenden, wie in EN ISO 11290-1 beschrieben.

9.6 Bewertung der morphologischen und physiologischen Eigenschaften und der biochemischen Reaktionen

L. monocytogenes ist ein grampositives stäbchenförmiges Bakterium, das im Katalasetest eine positive Reaktion zeigt.

L. monocytogenes werden nach den in Tabelle 2 aufgeführten verbindlichen und optionalen Untersuchungen bestätigt.

9.7 Zusätzliche Charakterisierung isolierter Stämme (optional)

Isolate, die als *L. monocytogenes* (9.6) angenommen werden, dürfen zur weiteren Charakterisierung an anerkannte nationale oder regionale *Listeria*-Referenzlaboratorien geschickt werden oder (wenn keine derartigen Laboratorien verfügbar sind), an die WHO-Kollaborationszentren (WHO: World Health Organization) für *Listerien*. Der Sendung müssen alle möglichen Informationen zu dem Stamm (den Stämmen) beiliegen.

10 Angabe der Ergebnisse

Entsprechend der Auswertung der Ergebnisse (siehe 9.6) wird angegeben, ob in der Prüfmenge, bezogen auf die Masse in Gramm oder das Volumen in Milliliter der untersuchten Probe, *L. monocytogenes* nachgewiesen wurde oder nicht.

11 Leistungsmerkmale des Verfahrens

11.1 Ringversuche

Die Leistungsmerkmale des Verfahrens wurden in einem Ringversuch ermittelt; dabei wurden Spezifität, Empfindlichkeit sowie der positive und der negative Vorhersagewert des Verfahrens bestimmt. Die Daten sind in Anhang C zusammengefasst.

11.2 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit ist definiert als die Anzahl der festgestellten positiven Proben, dividiert durch die Anzahl der untersuchten Proben mit einem bestimmten Kontaminationsgrad. Die Ergebnisse hängen somit von dem Kontaminationsgrad der Probe ab.

11.3 Spezifität

Die Spezifität ist definiert als die Anzahl der festgestellten negativen Proben, dividiert durch die Anzahl der untersuchten Blindproben.

11.4 Positiver Vorhersagewert (PPV, en: positive predictive value)

Der positive Vorhersagewert (PPV) gibt das Verhältnis von positiven Proben, die als positiv identifiziert wurden, zu allen Proben mit positiven Untersuchungsergebnissen (einschließlich der fälschlicherweise als positiv identifizierten Proben) an.

11.5 Negativer Vorhersagewert (NPV, en: negative predictive value)

Der negative Vorhersagewert (NPV) gibt das Verhältnis von negativen Proben, die als negativ identifiziert wurden, zu allen Proben mit negativen Untersuchungsergebnissen (einschließlich der fälschlicherweise als negativ identifizierten Proben) an.

12 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss das angewendete Verfahren und die Untersuchungsergebnisse enthalten. Er muss auch alle Einzelheiten des Verfahrens angeben, die in diesem Dokument nicht festgelegt sind oder als frei wählbar betrachtet werden, zusammen mit Einzelheiten aller Umstände, die das Untersuchungsergebnis beeinflusst haben könnten (siehe Abschnitt 10).

Der Untersuchungsbericht muss alle Angaben enthalten, die zur vollständigen Identifizierung der Probe erforderlich sind.

13 Qualitätssicherung

Das Labor sollte ein klar definiertes Qualitätslenkungssystem haben, um sicherzustellen, dass die Ausrüstung, die Reagenzien und Verfahren für die Untersuchung geeignet sind. Die Verwendung von positiven Kontrollen, negativen Kontrollen und Blindproben sind Teil der Untersuchung. Die Leistungsprüfung der Nährmedien ist in Abschnitt B.5 festgelegt und in EN ISO 11133:2014¹ beschrieben.

Anhang A (normativ)

Verfahrensschema

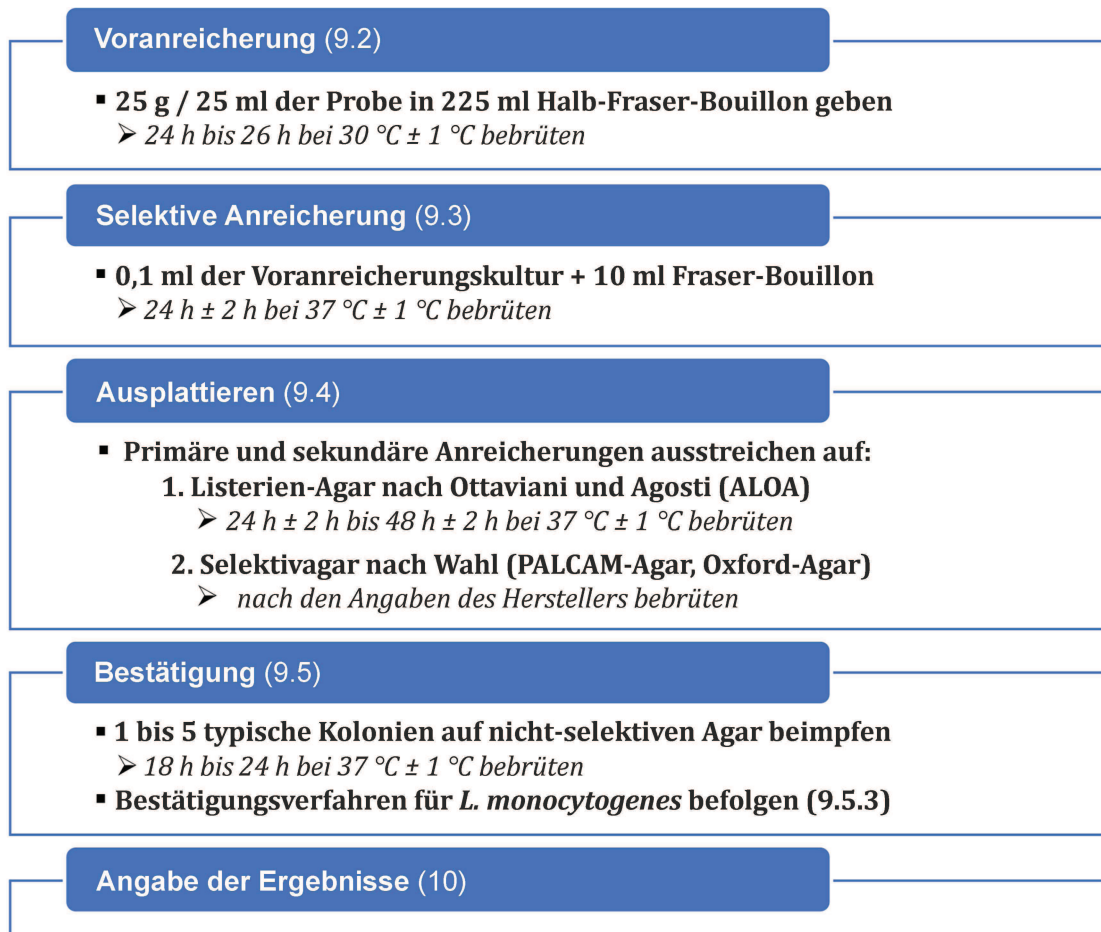


Bild A.1 — Fließschema des Nachweisverfahrens für *Listeria monocytogenes* in Proben von mikrobiellen Pflanzen-Biostimulanzien und aus dem Bereich der mikrobiellen Produktion