

DIN EN 17711



ICS 65.080

Entwurf

Einsprüche bis 2023-06-14
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17711:2022-07

**Pflanzen-Biostimulanzien –
Nachweis von *Vibrio* spp.;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17711:2023**

Plant biostimulants –
Detection of *Vibrio* spp.;
German and English version prEN 17711:2023

Biostimulants des végétaux –
Détection de *Vibrio* spp.;
Version allemande et anglaise prEN 17711:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-04-14 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 85 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17711:2023) 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.

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

ISO 5725-2:2019 siehe DIN ISO 5725-2:2022-05

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 17711:2022-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Änderung der Veröffentlichungsform von einer Technischen Spezifikation zu einer Europäischen Norm;
- b) der informative Anhang E mit Ringversuchsdaten zur Wiederhol- und Vergleichpräzision des Verfahrens wurde ergänzt;
- c) der informative Anhang ZA zum Zusammenhang mit der Verordnung für EU-Düngeprodukte wurde ergänzt.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 5725-2:2022-05, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens (ISO 5725-2:2019); Text Deutsch und Englisch*

– *Entwurf* –

E DIN EN 17711:2023-05

– Leerseite –

April 2023

prEN 17711

Pflanzen-Biostimulanzien – Nachweis von *Vibrio* spp.

Plant biostimulants – Detection of *Vibrio* spp.

Biostimulants des végétaux – Détection de *Vibrio* spp.

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	6
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	9
4.1 Allgemeines	9
4.2 Primäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium	9
4.3 Sekundäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium	9
4.4 Isolierung und Identifizierung	10
4.5 Bestätigung	10
5 Nährmedien und Reagenzien	10
5.1 Anreicherungsmedium: alkalisches Peptonwasser (APW) [en: alkaline saline peptone water (ASPW)]	10
5.2 Festes selektives Isolierungsmedium	10
5.2.1 Erstes Medium: Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar-Medium (TCBS; en: thiosulfate citrate bile and sacrose agar)	10
5.2.2 Zweites Medium	11
5.3 Kochsalz-Nähragar (SNA, en: saline nutrient agar)	11
5.4 Reagenz für den Nachweis von Oxidase	11
5.5 Reagenzien für biochemische Untersuchungen	11
5.5.1 L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC)	11
5.5.2 Arginin-Dihydroxylase-Salzmedium (ADH)	11
5.5.3 Reagenz für den Nachweis von β -Galactosidase	11
5.5.4 Salzmedium für den Nachweis von Indol	11
5.5.5 Salzhaltiges Peptonwasser	11
5.5.6 Natriumchloridlösung	11
5.5.7 Toluol, analysenrein.	12
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien	12
7 Probenahme	12
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	12
9 Durchführung (siehe Bild A.1)	12
9.1 Prüfmenge und Erstverdünnung	12
9.2 Primäre selektive Anreicherung	13
9.3 Sekundäre selektive Anreicherung	14
9.4 Isolierung und Identifizierung	14
9.5 Bestätigung	15
9.5.1 Allgemeines	15
9.5.2 Auswahl der Kolonien für die Bestätigung und Herstellung von Reinkulturen	15
9.5.3 Untersuchungen zur präsumtiven Identifizierung	15
9.5.4 Biochemische Bestätigung	16
10 Angabe der Ergebnisse	18
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens	18
11.1 Empfindlichkeit	18
11.2 Spezifität	18
11.3 LOD50	18
11.4 Präzision	18
12 Untersuchungsbericht	18
Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens	20
Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien und Reagenzien	21
B.1 Einleitung	21

B.2	Wasser	21
B.3	Alkalisches Peptonwasser (APW)	21
B.3.1	Zusammensetzung	21
B.3.2	Herstellung	21
B.4	Thiosulfat-Citrat-Galle- und Saccharose-Agar (TCBS)	22
B.4.1	Zusammensetzung	22
B.4.2	Herstellung	22
B.4.3	Herstellung der Agarplatten	22
B.5	Kochsalz-Nähragar (SNA)	22
B.5.1	Zusammensetzung	22
B.5.2	Herstellung	22
B.5.3	Herstellung der Agarplatten	23
B.5.4	Herstellung der Schrägagarröhrchen mit Kochsalz-Nähragar	23
B.6	Reagenz für den Nachweis von Oxidase	23
B.6.1	Zusammensetzung	23
B.6.2	Herstellung	23
B.7	L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC)	23
B.7.1	Zusammensetzung	23
B.7.2	Herstellung	23
B.8	Arginin-Dihydroxylase-Salzmedium (ADH)	24
B.8.1	Zusammensetzung	24
B.8.2	Herstellung	24
B.9	Nachweis von β -Galactosidase	24
B.9.1	ONPG-Lösung	24
B.9.2	Pufferlösung	24
B.9.3	Vollständiges Reagenz	25
B.10	Salzmedium für den Nachweis von Indol	25
B.10.1	Tryptophan-Salzmedium	25
B.10.2	Kovacs-Reagenz	25
B.11	Salzhaltiges Peptonwasser	25
B.11.1	Zusammensetzung	25
B.11.2	Herstellung	26
B.12	Natriumchloridlösung	26
B.12.1	Zusammensetzung	26
B.12.2	Herstellung	26
B.13	Tris-Acetat-EDTA-(TAE-)Puffer	26
B.13.1	Zusammensetzung	26
B.13.2	Herstellung	26
Anhang C (informativ) Konventionelle PCR für den Nachweis von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , Genen des direkten thermostabilen Hämolsins (tdh) und des direkten thermostabilen verwandten Hämolsins (trh), <i>Vibrio cholerae</i> und <i>Vibrio vulnificus</i>		27
C.1	Allgemeines	27
C.2	Geräte und Materialien	27
C.2.1	Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (oder ein Puffer mit für den Zweck vergleichbarer Leistung)	27
C.2.2	Mastermix	27
C.3	DNA-Extraktion	28
C.4	Durchführung der konventionellen PCR	28
C.5	Primer und Sonden	29
C.5.1	Allgemeines	29
C.5.2	<i>Vibrio-parahaemolyticus</i> -Primer (konventionelle PCR)	30
C.5.3	<i>Vibrio-parahaemolyticus</i> -Primer für Gene des direkten thermostabilen Hämolsins (tdh) und des direkten thermostabilen verwandten Hämolsins (trh) (konventionelle PCR)	30
C.5.4	<i>Vibrio-cholerae</i> -Primer (konventionelle PCR)	30
C.5.5	<i>Vibrio-vulnificus</i> -Primer (konventionelle PCR)	30
C.5.6	PCR-Bedingungen — VptoxR und VVH	30
C.5.7	PCR-Bedingungen — prVC	31

C.5.8	PCR-Bedingungen — <i>tdh</i> und <i>trh</i>	31
C.6	Kontrollmaterial — konventionelle PCR	31
Anhang D	(informativ) Real-Time-PCR für den Nachweis von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , dem Gen des direkten thermostabilen Hämolysins (<i>tdh</i>) und <i>Vibrio vulnificus</i>	33
D.1	Allgemeines	33
D.2	Geräte und Materialien	33
D.2.1	Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (oder ein Puffer mit für den Zweck vergleichbarer Leistung)	33
D.2.2	Mastermix	33
D.2.3	Zusammensetzung des Mastermix	33
D.3	DNA-Extraktion	33
D.4	Real-Time-PCR	33
D.5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> — Primer und Hydrolyse-Sonden	34
D.6	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> — Primer und Hydrolyse-Sonden für das Gen des thermostabilen direkten Hämolysins (<i>tdh</i>)	34
D.7	<i>Vibrio vulnificus</i> — Primer und Hydrolyse-Sonden	35
D.8	PCR-Bedingungen	35
D.9	Kontrollmaterial — Real-Time-PCR	35
Anhang E	(informativ) Wiederholpräzision und Vergleichpräzision	36
E.1	Im Ringversuch verwendete Materialien	36
E.2	Proben	36
E.3	Durchführung	36
E.4	Wiederholungen	37
E.5	Ergebnisse	37
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	38
Literaturhinweise		39

Bilder

Bild A.1	— Fließschema des Verfahrens für den Nachweis von enteropathogenen <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. cholerae</i> und <i>V. vulnificus</i>	20
----------	--	----

Tabellen

Tabelle 1	— Leistungsprüfung des Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar-Mediums (TCBS)	10
Tabelle 2	— Primäre Bebrütung und Zielspezies/Produktzustand	13
Tabelle 3	— Sekundäre Bebrütung und Zielspezies/Produktzustand	14
Tabelle 4	— Interpretation der biochemischen Untersuchungen	17
Tabelle C.1	— Zusammensetzung des Mastermix	28
Tabelle C.2	— PCR-Bedingungen — <i>VptoxR</i> und <i>VVH</i>	31
Tabelle C.3	— PCR-Bedingungen — <i>prVC</i>	31
Tabelle C.4	— PCR-Bedingungen — <i>tdh</i> und <i>trh</i>	31
Tabelle C.5	— Referenzstämme	32
Tabelle D.1	— Zusammensetzung des Mastermix	33
Tabelle D.2	— PCR-Bedingungen	35
Tabelle D.3	— Referenzstämme	35
Tabelle E.2	— Im Ringversuch untersuchte Materialien	36
Tabelle E.3	— Ergebnisse des Ringversuchs	37
Tabelle E.4	— Kontingenztafel für die Proben ML, MS, BL und PS	37

Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Verordnung (EU) 2019/1009	38
--	-----------

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17711:2023) 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 17711:2022 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 SR M/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 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.

Aufgrund der großen Vielfalt an Pflanzen-Biostimulanzienprodukten ist das in diesem Dokument beschriebene horizontale Verfahren nicht unbedingt bis ins Detail für bestimmte Produkte geeignet. In diesem Fall dürfen andere Verfahren, die spezifisch für diese Produkte sind, angewendet werden, wenn dies aus berechtigten technischen Gründen eindeutig notwendig ist. Dennoch werden alle Anstrengungen unternommen, dieses horizontale Verfahren soweit wie möglich anzuwenden.

Die Harmonisierung der Untersuchungsverfahren kann nicht sofort erfolgen. Für bestimmte Produktgruppen können bereits Internationale Normen und/oder Nationale Normen bestehen, die diesem horizontalen Verfahren nicht entsprechen. Es ist zu hoffen, dass diese Normen bei einer Überarbeitung an dieses Dokument angepasst werden, sodass es sich bei den verbleibenden Abweichungen von diesem horizontalen Verfahren letztendlich nur um solche mit etablierten technischen Gründen handelt.

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 legt ein horizontales Verfahren zum Nachweis von enteropathogenen *Vibrio* spp. fest, die Erkrankungen des Menschen am oder über den Darmtrakt verursachen [1]. Die Spezies, deren Nachweis die hier aufgeführten Verfahren einbeziehen, sind *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus*.

Das Dokument gilt für

— mikrobielle Pflanzen-Biostimulanzen.

ANMERKUNG 1 Die Weltgesundheitsorganisation (WHO; en: World Health Organization) hat *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* als die wichtigsten Kontaminanten von *Vibrio* spp. identifiziert [1].

ANMERKUNG 2 Eine Bestätigung durch PCR-Tests ist möglich; in diesem Fall muss das Labor das Verfahren und die erzeugten Daten validieren.

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 17702-1:—,¹ *Pflanzen-Biostimulanzen — Probenahme und Probenvorbereitung — Teil 1: Probenahme*

EN 17724:—,² *Pflanzen-Biostimulanzen — Terminologie*

EN ISO 7218:2007,³ *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 7218:2007)*

EN ISO 11133:2014,⁴ *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien (ISO 11133:2014)*

EN ISO 3696:1995, *Wasser für analytische Laborzwecke — Spezifikation und Prüfverfahren (ISO 3696:1987)*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach prEN 17724:—⁵ 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>

1 In Vorbereitung.

2 In Vorbereitung.

3 Geändert durch EN ISO 7218:2007/A1:2013.

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

5 In Vorbereitung.

3.1

potentiell enteropathogene *Vibrio* spp.

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

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

3.2

Nachweis von potentiell enteropathogenen *Vibrio* spp.

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

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

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

Die Anzüchtung bestimmter *Vibrio* spp. kann verbessert werden, indem in Abhängigkeit von der Zielspezies oder dem Zustand der Matrix verschiedene Bebrütungstemperaturen verwendet werden. So wird in flüssigen Produkten die Anzüchtung von *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* durch Anreicherung bei 41,5 °C gesteigert, und die Anzüchtung von *V. vulnificus* wird durch Anreicherung bei 37 °C gesteigert. In festen Produkten dagegen wird die Anzüchtung von *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* durch Anreicherung bei 37 °C gesteigert.

Wenn der Nachweis von *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* erforderlich ist, sollten alle angegebenen Bebrütungstemperaturen verwendet werden. Wenn kein paralleler Nachweis von *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* erforderlich ist, darf/dürfen das/die spezifische(n) Verfahren entsprechend der gesuchten Spezies gewählt werden. Solch eine Auswahl sollte klar im Untersuchungsbericht angegeben werden.

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

4.2 Primäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium

Das primäre Anreicherungsmedium, alkalisches Peptonwasser (APW) (5.1), wird bei Umgebungstemperatur mit der Prüfmenge beimpft und dann für 6 h bei 41,5 °C und/oder für 6 h bei 37 °C bebrütet. Die Bebrütungsbedingungen richten sich nach der Zielspezies und dem Zustand des Produkts.

Für den Nachweis jeglicher Zielspezies in festen Produkten sollte die primäre Anreicherung bei 37 °C erfolgen.

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

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

4.3 Sekundäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium

Das zweite Anreicherungsmedium (APW) wird mit den in 4.2 erhaltenen Kulturen beimpft. Die Bebrütung des beimpften Anreicherungsmediums erfolgt bei 41,5 °C für 18 h und/oder 37 °C für 18 h.

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

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

4.4 Isolierung und Identifizierung

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

- Thiosulfat-Citrat-Galle- und Saccharose-Agar-(TCBS-)Medium (5.2.1);
- ein weiteres geeignetes festes Selektivmedium (bleibt der Auswahl des Labors überlassen), wie chromogener Agar, ergänzend zum TCBS-Medium (5.2.2).

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

4.5 Bestätigung

Die nach 4.4 isolierten präsumtiven Kolonien von *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* werden subkultiviert und durch geeignete biochemische Untersuchungen bestätigt. Eine Bestätigung durch PCR-Test ist ebenfalls möglich; die PCR-Verfahren sind in Anhang C und Anhang D beschrieben, das Labor muss jedoch das Verfahren und die erzeugten Daten validieren.

5 Nährmedien und Reagenzien

Zur allgemeinen Laborpraxis wird auf EN ISO 7218:2007 verwiesen.

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

Zur Leistungsprüfung von Nährmedien wird auf EN ISO 11133:2014 verwiesen.

5.1 Anreicherungsmedium: alkalisches Peptonwasser (APW) [en: alkaline saline peptone water (ASPW)]

Wie in B.3 festgelegt.

5.2 Festes selektives Isolierungsmedium

5.2.1 Erstes Medium: Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar-Medium (TCBS; en: thiosulfate citrate bile and sacrose agar)

Wie in B.4 festgelegt. Für Daten der Leistungsprüfung siehe Tabelle 1.

Tabelle 1 — Leistungsprüfung des Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar-Mediums (TCBS)

Funktion	Bebrütung	Kontrollstämme	WDCM ^a	Kontrollverfahren	Kriterien ^e	Charakteristische Reaktionen
Produktivität	37 °C ± 1 °C für 24 h ± 3 h	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	00185 ^b	qualitativ	gutes Wachstum (2)	grüne Kolonien (Saccharose-negativ)
	37 °C ± 1 °C für 24 h ± 3 h	<i>Vibrio furnissii</i>	00186 ^b	qualitativ	gutes Wachstum (2)	gelbe Kolonien (Saccharose-positiv)

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Funktion	Bebrütung	Kontrollstämme	WDCM^a	Kontrollverfahren	Kriterien^e	Charakteristische Reaktionen
Selektivität	37 °C ± 1 °C für 24 h ± 3 h	<i>Escherichia coli</i> ^{c,d}	00012, 00013 oder 00090	qualitativ	vollständige Hemmung (0)	—
^a Katalog der Stämme des World Data Centre for Microorganisms (WDCM), erhältlich unter http://refs.wdcm.org ^b Als Minimum zu verwendender Stamm (siehe EN ISO 11133:2014). ^c Einige nationale Beschränkungen und Vorschriften können die Verwendung eines anderen <i>E.-coli</i>-Serovars erfordern. Bezüglich der Wahl von <i>E.-coli</i>-Serovaren sind die nationalen Anforderungen heranzuziehen. ^d Freie Wahl des Stammes; einer der Stämme muss als Minimum verwendet werden (siehe EN ISO 11133:2014). ^e Das Wachstum wird kategorisiert als: 0: kein Wachstum; 1: schwaches Wachstum (teilweise Hemmung); 2: gutes Wachstum (siehe EN ISO 11133:2014).						

5.2.2 Zweites Medium

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

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

Wie in B.5 festgelegt.

5.4 Reagenz für den Nachweis von Oxidase

Wie in B.6 festgelegt.

5.5 Reagenzien für biochemische Untersuchungen

5.5.1 L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC)

Wie in B.7 festgelegt.

5.5.2 Arginin-Dihydroxylase-Salzmedium (ADH)

Wie in B.8 festgelegt.

5.5.3 Reagenz für den Nachweis von β -Galactosidase

Wie in B.9 festgelegt.

5.5.4 Salzmedium für den Nachweis von Indol

Wie in B.10 festgelegt.

5.5.5 Salzhaltiges Peptonwasser

Wie in B.11 festgelegt.

5.5.6 Natriumchloridlösung

Wie in B.12 festgelegt.

5.5.7 Toluol, analysenrein.

6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

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

Übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Labors (siehe EN ISO 7218:2007) und insbesondere Folgendes:

6.1 **Kühlschrank**, auf $5\text{ °C} \pm 3,0\text{ °C}$ einstellbar.

6.2 **Brutschrank**, auf $37\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$ einstellbar.

6.3 **Brutschrank**, auf $41,5\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$ einstellbar.

6.4 **Gefrierschrank**, auf $< -15\text{ °C}$ einstellbar.

6.5 **Mikrozentrifugenröhrchen**, mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml und 2,0 ml.

6.6 **Mikrozentrifuge**, für Reaktionsröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml und 2,0 ml und geeignet für eine Beschleunigung von 10 000 g.

6.7 **Thermoblock**, geeignet für den Betrieb bei $95\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$ oder gleichwertig.

6.8 **Vortexmischer**.

6.9 **Messpipetten und Pipettenfilterspitzen**, für Volumina zwischen 1 µl und 1 000 µl.

6.10 **Magnetrührer** mit Magnetrührstab.

6.11 **Stomacher**.

7 Probenahme

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

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

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird nach prEN 17702-1:—¹ und/oder dem Dokument, das sich mit dem betreffenden Produkt befasst, vorbereitet. Liegt kein spezifisches Dokument vor, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

9 Durchführung (siehe Bild A.1)

9.1 Prüfmenge und Erstverdünnung

Dieses Dokument wurde für Prüfmengen von bis zu 25 g oder 25 ml validiert. Eine kleinere Prüfmenge darf ohne die Notwendigkeit einer zusätzlichen Validierung/Verifizierung verwendet werden, vorausgesetzt, dass zwischen der (Vor-)Anreicherungsbouillon und der Prüfmenge dasselbe Verhältnis beibehalten wird. Eine größere Prüfmenge als die ursprünglich validierte darf verwendet werden, wenn in einer Validierungs-/Veri-

fizierungsuntersuchung nachgewiesen wurde, dass keine nachteiligen Auswirkungen auf den Nachweis von *Vibrio* spp. vorliegen.

ANMERKUNG Die Validierung kann in Übereinstimmung mit dem entsprechenden Dokument von EN ISO 16140 (alle Teile) durchgeführt werden. Die Verifizierung bezüglich des Poolens (Bündelns) von Proben kann nach der in EN ISO 6887-1:2017, Anhang C, beschriebenen Verfahrensanweisung durchgeführt werden.

Zur Herstellung der Erstverdünnungen wird das erste Anreicherungsmedium (APW), wie in 5.1 festgelegt, verwendet.

Die Erstverdünnung wird mit einer repräsentativen Prüfmenge nach dem folgenden Verfahren hergestellt, das die verschiedenen Formulierungen von Produkten auf Basis von Biostimulanzen berücksichtigt.

a) Flüssigkeit – wasserbasierte Formulierungen und Flüssigkeit – ölbasierte Formulierungen:

Prüfmengen (25 g oder 25 ml) werden entnommen und in 225 ml Anreicherungsmedium bei Raumtemperatur in einem Kolben homogenisiert. Das Homogenisieren erfolgt mindestens 10 Minuten lang mit einem Magnetrührwerk bei halber Drehzahl, bis die Verteilung optimal ist.

b) Feste (WP- oder WDG-)Formulierungen:

Es werden Prüfmengen (25 g oder 25 ml) entnommen und in 225 ml Anreicherungsmedium bei Raumtemperatur in einem sterilen Beutel mit einem Stomacher für 2 Minuten bei höchster Drehzahl homogenisiert.

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

Es werden Prüfmengen (25 g oder 25 ml) entnommen und in 225 ml Anreicherungsmedium bei Raumtemperatur in einem sterilen Beutel mit einem Stomacher 2 Minuten lang bei höchster Drehzahl homogenisiert, bis die Verteilung optimal ist. Dieser Vorgang wird bei Bedarf zweimal wiederholt.

Bei großen Mengen (größer als 25 g oder 25 ml) sollte das APW auf $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und/oder $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (4.2) erwärmt werden, bevor es mit der Prüfmenge beimpft wird.

Um den Arbeitsaufwand zu verringern, dürfen bei mehr als einer Prüfmenge von 25 g oder 25 ml, stammend aus festgelegten zu untersuchenden Chargen, und wenn ein Nachweis speziell für dieses Produkt vorliegt, dass eine Vereinigung (Zusammenfügen der Prüfmengen) die Ergebnisse nicht verändert, die Prüfmengen vermischelt werden. Zum Beispiel ist es möglich, wenn 10 Prüfmengen von 25 g oder 25 ml untersucht werden, diese 10 Einheiten zu kombinieren, um eine Sammelprobe von 250 g oder 250 ml zu erhalten, und 2,25 l Anreicherungsmedium hinzuzufügen.

Die Keimzahlen von *Vibrio* spp. verringern sich unter Umständen signifikant bei einer Lagerung bei Kühltemperaturen. Die Lagerung von Proben sowie in geringerem Maße die Lagerung von Suspensionen sollte bei derartigen Temperaturen möglichst vermieden werden und ansonsten auf ein Minimum begrenzt sein.

9.2 Primäre selektive Anreicherung

Die Erstverdünnungen (9.1) werden für $6\text{ h} \pm 1\text{ h}$ bei $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und/oder $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, wie in Tabelle 2 angegeben, bebrütet.

Tabelle 2 — Primäre Bebrütung und Zielspezies/Produktzustand

Zielspezies von <i>Vibrio</i> spp. in flüssigen Produktformulierungen			
Bebrütungstemperatur	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
$41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$	√	√	

Tabelle 2 (fortgesetzt)

37 °C ± 1 °C			√
Zielspezies von <i>Vibrio</i> spp. in festen getrockneten Produktformulierungen			
Bebrütungstemperatur	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
41,5 °C ± 1 °C			
37 °C ± 1 °C	√	√	√

9.3 Sekundäre selektive Anreicherung

1 ml der in 9.2 erhaltenen Kultur wird von der Oberfläche entnommen und in ein Röhrchen mit 10 ml APW (5.1) überführt. Es wird empfohlen, die Probe vor Entnahme des Aliquots nicht zu schütteln.

Das APW wird bei 41,5 °C ± 1 °C und/oder 37 °C ± 1 °C für 18 h ± 1 h, wie in Tabelle 3 angegeben, bebrütet.

ANMERKUNG Die aus 9.3. erhaltenen Kulturen und/oder gekochten Bouillons können auch mittels PCR gescreent werden.

Tabelle 3 — Sekundäre Bebrütung und Zielspezies/Produktzustand

Zielspezies von <i>Vibrio</i> spp. in allen Produktzuständen			
Bebrütungstemperatur	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
41,5 °C ± 1 °C	√	√	
37 °C ± 1 °C			√

9.4 Isolierung und Identifizierung

Die in APW angezüchteten Kulturen (9.2 und 9.3) werden mit einer 1-µl-Öse auf der Oberfläche einer TCBS-Agarplatte (5.2.1) so ausplattiert, dass sich gut voneinander abgegrenzte Kolonien entwickeln können.

Mit dem ausgewählten zweiten selektiven Isolierungsmedium (5.2.2) ist unter Verwendung einer frischen Öse in der gleichen Weise vorzugehen.

Die Agarplatten werden umgedreht:

- TCBS-Agarplatten werden für 24 h ± 3 h bei 37 °C ± 1 °C bebrütet;
- die Bebrütung des zweiten Isolierungsmediums erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers.

Nach der Bebrütung sind das TCBS-Medium und das zweite selektive Medium auf die Anwesenheit typischer Kolonien präsumtiver pathogener *Vibrio* spp. zu untersuchen. Ihre Position ist auf dem Boden der Platten zu markieren.

Auf TCBS-Agar weisen *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und *V. cholerae* verschiedene typische Koloniemorphologien auf:

- typische Kolonien von *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* sind glatt, grün (negative Saccharose) und haben einen Durchmesser von 2 mm bis 3 mm;

- typische Kolonien von *V. cholerae* sind glatt, gelb (positive Saccharose) und haben einen Durchmesser von 1 mm bis 2 mm.

Das zweite selektive Medium wird auf die Anwesenheit von Kolonien untersucht, die aufgrund ihrer Merkmale als mögliche Isolate von *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und/oder *V. cholerae* infrage kommen.

ANMERKUNG 1 Eine Identifizierung von *Vibrio*-spp.-Kolonien beruht im Wesentlichen auf Erfahrung, und ihr Aussehen kann sich nicht nur von einer Spezies zur anderen unterscheiden, sondern auch von Nährmediumcharge zu Nährmediumcharge.

ANMERKUNG 2 Für eine verbesserte Anzucht von *V. vulnificus* haben sich Medien als wirkungsvoll gezeigt, die Derivate von Cellobiose-Polymyxin B-Colistin und Cellobiose-Colistin enthalten [3].

9.5 Bestätigung

9.5.1 Allgemeines

Bei Anwendung dieses Dokuments können *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und *V. cholerae* durch biochemische Vorgehensweisen bestätigt werden. Die Bestätigung darf im Endbenutzer-Labor oder durch ein spezialisiertes Referenzlabor durchgeführt werden. Andere *Vibrio* spp. dürfen unter Verwendung dieses Dokuments isoliert werden. Für die Bestätigung mittels PCR-Tests muss das Labor das Verfahren und die generierten Daten validieren; siehe Anhang C und Anhang D.

Wenn als zuverlässig erwiesen, dürfen kommerziell erhältliche biochemische Testkits für eine Identifizierung von *Vibrio* auf Speziesebene verwendet werden, sofern die Testkits mit einer ausreichend salzhaltigen Suspension oder Verdünnungsflüssigkeit der zu identifizierenden Bakterien beimpft werden. Weitere Voraussetzung ist, dass die Datenbank oder Identifikationstabelle für das Testkit auf Reaktionen basiert, die durch Verwendung ähnlicher Medien erhalten wurden, wie in dem vorliegenden Dokument beschrieben. Diese Testkits müssen in Übereinstimmung mit den Anweisungen des Herstellers verwendet werden.

Wenn als zuverlässig erwiesen, dürfen kommerziell erhältliche Testkits basierend auf molekularbiologischen Nachweisverfahren verwendet werden, um *Vibrio* auf Speziesebene zu bestimmen. Diese Testkits müssen in Übereinstimmung mit den Anweisungen des Herstellers verwendet werden.

9.5.2 Auswahl der Kolonien für die Bestätigung und Herstellung von Reinkulturen

Zur Bestätigung wird von jedem selektiven Medium (9.4) mindestens eine gut abgegrenzte Kolonie, die als typisch betrachtet wird oder den einzelnen gesuchten potentiell pathogenen *Vibrio* spp. ähnlich ist, subkultiviert. Sofern das Ergebnis der ersten isolierten Kolonie negativ ist, sollten vier weitere gut abgegrenzte Kolonien untersucht werden.

Bei Proben, bei denen es wichtig ist, den Nachweis von potentiell pathogenen *V. parahaemolyticus* zu optimieren, wird empfohlen, dass mindestens fünf und, wo möglich, alle Kolonien, die typische *V. parahaemolyticus*-Koloniemorphologien aufweisen, für die nachgeschaltete Untersuchung subkultiviert werden.

Die ausgewählten Kolonien werden auf Kochsalz-Nähragar-Platten (SNA) (5.3) oder einem geeigneten Medium nach Wahl des Labors abgeimpft, um isolierte Kolonien zu erhalten. Die Bebrütung erfolgt für $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

9.5.3 Untersuchungen zur präsumtiven Identifizierung

9.5.3.1 Oxidase-Prüfung

Unter Verwendung einer Impföse, eines glatten Platin-Iridium-Impfdrahts oder eines Glasstabs wird ein Anteil der Reinkultur vom Kochsalz-Nähragar (9.5.2) entnommen und auf das mit Oxidase-Reagenz befeuchtete Filterpapier gestrichen (5.4). Alternativ wird ein kommerziell erhältlicher Test verwendet, der entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt wird.

Weder eine Impföse aus Nickel-Chrom noch ein Metalldraht dürfen verwendet werden. Impfösen aus Nickel- oder Chrom-Draht können zu verfälschten positiven Ergebnissen führen und sollten vermieden werden.

9.5.3.2 Mikroskopische Untersuchung (optional)

Für jede in 9.4 erhaltene Reinkultur sind Untersuchungen nach a) und b) durchzuführen.

- a) Für die Gram-Färbung wird ein Ausstrich vorbereitet; siehe EN ISO 7218. Nach der Färbung wird mit einem Mikroskop hinsichtlich Morphologie und Gram-Reaktion untersucht und die Ergebnisse werden aufgezeichnet.
- b) Ein Röhrchen mit APW (5.1) wird beimpft. Es wird für 1 h bis 6 h bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ bebrütet. Ein Tropfen der Kultur wird auf einen sauberen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und unter dem Mikroskop auf Beweglichkeit untersucht. Kulturen mit einem positiven Ergebnis in Bezug auf Beweglichkeit werden notiert.

9.5.3.3 Auswahl der Kulturen

Zur Bestätigung werden die Oxidase-positiven Kolonien zurückbehalten.

Auch gramnegative Kolonien, die in der Beweglichkeitsuntersuchung positiv waren (falls durchgeführt), werden zur Bestätigung zurückbehalten.

9.5.4 Biochemische Bestätigung

9.5.4.1 Allgemeines

Unter Verwendung einer Impföse werden die in 9.5.4.2 bis 9.5.4.6 angegebenen Medien mit jeder Kultur beimpft, die aus den Kolonien von 9.5.2 gewonnen wurde.

9.5.4.2 L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (5.5.1)

Das flüssige Medium wird knapp unter der Oberfläche beimpft. Etwa 1 ml steriles Mineralöl wird auf die Oberfläche des Mediums gegeben.

Die Bebrütung erfolgt für $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

Trübung und eine violette Färbung nach der Bebrütung kennzeichnen eine positive Reaktion (bakterielles Wachstum und Decarboxylierung von L-Lysin). Eine gelbe Färbung kennzeichnet eine negative Reaktion.

9.5.4.3 Arginin-Dihydrolase-Salzmedium (5.5.2)

Das flüssige Medium wird knapp unter der Oberfläche beimpft. Etwa 1 ml steriles Mineralöl wird auf die Oberfläche des Mediums gegeben.

Die Bebrütung erfolgt für $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

Trübung und eine violette Färbung nach der Bebrütung kennzeichnen eine positive Reaktion (bakterielles Wachstum und Arginin-Dihydrolase-Aktivität). Eine gelbe Färbung kennzeichnet eine negative Reaktion.

9.5.4.4 Nachweis von β -Galactosidase (5.5.3)

Ein Röhrchen mit 0,25 ml Natriumchloridlösung (5.5.6) wird mit der präsumtiven Kolonie beimpft.

Ein Tropfen Toluol wird hinzugefügt und das Röhrchen geschüttelt.

Das Röhrchen wird in den Brutschrank (6.2) gestellt und bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für etwa 5 min stehen gelassen.

0,25 ml des Reagenzes für den Nachweis von β -Galactosidase werden hinzugefügt, und es wird gemischt.

Das Röhrchen wird in das auf $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ eingestellte Wasserbad gestellt, dort für $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ stehen gelassen und in zeitlichen Abständen untersucht.

Eine gelbe Färbung kennzeichnet eine positive Reaktion (Anwesenheit von β -Galactosidase). Die Reaktion ist oft nach 20 min sichtbar. Das Ausbleiben einer Färbung nach 24 h kennzeichnet eine negative Reaktion.

Bei Verwendung von gebrauchsfertigen Papierscheiben (5.5.3) werden die Herstelleranweisungen befolgt.

9.5.4.5 Nachweis von Indol (5.5.4)

Ein Röhrchen mit 5 ml Tryptophan-Kochsalzmedium wird mit der präsumtiven Kolonie beimpft.

Die Bebrütung erfolgt für $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Nach der Bebrütung wird 1 ml Kovacs-Reagenz hinzugefügt (5.5.4).

Die Bildung eines roten Rings kennzeichnet eine positive Reaktion (Bildung von Indol). Ein gelbbrauner Ring kennzeichnet eine negative Reaktion.

9.5.4.6 Halotoleranz-Test (5.5.5)

Eine Reihe von salzhaltigem Peptonwasser mit aufsteigender Salzkonzentration (NaCl) wird erstellt: 0 %, 6 % und 10 % (5.5.5).

Jedes Röhrchen (5.5.5) wird mit der präsumtiven Kolonie beimpft.

Die Bebrütung erfolgt für $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

Eine Trübung zeigt an, dass das Bakterium bei der in dem Röhrchen mit salzhaltigem Peptonwasser vorliegenden Natriumchloridkonzentration wachsen kann.

9.5.4.7 Interpretation der biochemischen Untersuchungen

V. parahaemolyticus, *V. cholerae* und *V. vulnificus* zeigen im Allgemeinen die in Tabelle 4 aufgeführten Reaktionen.

Tabelle 4 — Interpretation der biochemischen Untersuchungen

Untersuchung	<i>Vibrio cholerae</i> ^a	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ^a	<i>Vibrio vulnificus</i> ^a
Oxidase	+	+	+
LDC	+	+	+
ADH	—	—	—
ONPG-Hydrolyse	+	—	+
Produktion von Indol	+	+	+
Wachstum in Peptonwasser mit:			
0 % NaCl	+	—	—
6 % NaCl	—	+	+
10 % NaCl	—	—	—
^a Das „+“-Zeichen kennzeichnet 76 % bis 89 % positive Reaktionen.			

ANMERKUNG 1 Die in Tabelle 4 angegebenen Reaktionen dienen als Leitfaden für die Identifizierung der aufgelisteten Spezies. Zusätzliche phänotypische Untersuchungen können erforderlich sein, um diese Spezies vollständig von den anderen und von nichtpathogenen *Vibrio* spp. zu unterscheiden.

ANMERKUNG 2 In seltenen Fällen sind *V. parahaemolyticus*-Stämme bei der ONPG-Hydrolyse positiv. Zusätzliche phänotypische und/oder molekulare Untersuchungen können erforderlich sein, um diese Stämme vollständig von den anderen und von nichtpathogenen *Vibrio* spp. zu unterscheiden.

9.5.4.8 Schritt-für-Schritt-Bestätigung (optional)

V. cholerae und *V. parahaemolyticus* weisen beide unterschiedliche Toleranzen des Salzgehaltes auf. Mit den in 9.5.3.3 ausgewählten Kulturen werden Wachstumsuntersuchungen in 10%igem salzhaltigem Peptonwasser (5.5.5) und Arginin-Dihydrolase-Untersuchungen (5.5.2) durchgeführt. Mit allen Kolonien, die kein Wachstum in 10%igem salzhaltigem Peptonwasser und eine negative Arginin-Dihydrolase-Reaktion zeigen, wird mit den weiteren Bestätigungsuntersuchungen fortgefahren.

Es ist ratsam, gleichzeitig auf Kochsalz-Nähragar (5.3) zu subkultivieren, um sicherzustellen, dass das „Nichtwachsen“ in 10%igem salzhaltigem Peptonwasser nicht auf das Absterben der Kultur zurückzuführen ist.

10 Angabe der Ergebnisse

Entsprechend der Auswertung der Ergebnisse wird angegeben, ob potentiell enteropathogene *Vibrio* spp. in einer Prüfmenge von 25 g oder 25 ml des Produkts nachgewiesen oder nicht nachgewiesen wurden. Dabei werden die relevanten Spezies und alle Pathogenitätsmerkmale benannt, sofern diese untersucht wurden.

11 Leistungsmerkmale des Verfahrens

11.1 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit ist definiert als die Anzahl der als positiv ermittelten Proben dividiert durch die Anzahl der bei einem vorgegebenen Kontaminationsgrad untersuchten Proben. Die Ergebnisse hängen somit von dem Kontaminationsgrad der Probe ab.

11.2 Spezifität

Die Spezifität ist definiert als die Anzahl der als negativ ermittelten Proben, dividiert durch die Anzahl der untersuchten Leerwertproben.

11.3 LOD50

Die LOD50 ist die Konzentration (KBE [koloniebildende Einheiten]/Probe), für die die Wahrscheinlichkeit des Nachweises 50 % beträgt.

11.4 Präzision

Genauere Angaben zu den im Ringversuch ermittelten Präzisionsdaten finden sich in Anhang E.

12 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss Folgendes enthalten:

- einen Titel bzw. eine Überschrift, z. B. „Untersuchungsbericht“;
- Name und Anschrift des Labors sowie den Ort, an dem die Untersuchung durchgeführt wurde, falls er sich von der Anschrift des Labors unterscheidet;

- eindeutige Kennzeichnung des Untersuchungsberichts (z. B. als fortlaufende Nummer) und auf jeder Seite eine Kennzeichnung, die sicherstellt, dass die Seite als Teil des Untersuchungsberichts erkannt wird, sowie eine eindeutige Kennzeichnung des Endes des Untersuchungsberichts;
- Verweisung auf dieses Dokument, d. h. prEN 17711:—¹, einschließlich des Jahres seiner Veröffentlichung;
- alle Einzelheiten, die zur Identifizierung der zu untersuchenden Probe/des zu untersuchenden Produkts notwendig sind (Hersteller, Produktbezeichnung, Chargennummer usw., alle Angaben, die zur vollständigen Identifizierung der Probe erforderlich sind);
- Datum und Ort der Probenahme, Probenahmeverfahren, Probenehmer, falls bekannt, und Einzelheiten über etwaige Umgebungsbedingungen während der Probenahme, die die Auswertung des Testergebnisses/der Testergebnisse beeinflussen können;
- das Datum, an dem die Untersuchung begonnen wurde und das Datum, an dem die Untersuchung beendet wurde;
- sämtliche Abweichungen im Hinblick auf die verwendeten Anreicherungsmedien oder die angewandten Bebrütungsbedingungen;
- alle in diesem Dokument nicht festgelegten oder als optional angesehenen Arbeitsbedingungen, zusammen mit allen Einzelheiten für eine vollständige Rückverfolgbarkeit oder zu allen Vorkommnissen, die die Ergebnisse beeinflusst haben können;
- die erhaltenen Ergebnisse und insbesondere, ob die Pathogenitätsmarker der isolierten Stämme bestätigt wurden;
- den Hinweis, ob ein positives Ergebnis bei Verwendung eines nicht in diesem Dokument angegebenen Isolierungsmediums (5.2.2) erzielt wurde;
- den/die Name(n), die Funktion(en) und die Unterschrift(en) oder gleichwertige Identifikation der Person(en), die den Untersuchungsbericht genehmigt hat/haben;
- sofern zutreffend eine Erklärung, dass sich das Ergebnis/die Ergebnisse nur auf die untersuchten Einheiten bezieht/beziehen;
- sofern zutreffend eine Erklärung über die Übereinstimmung/Nichtübereinstimmung mit Anforderungen und/oder Spezifikationen.

Anhang A (normativ)

Fließschema des Verfahrens

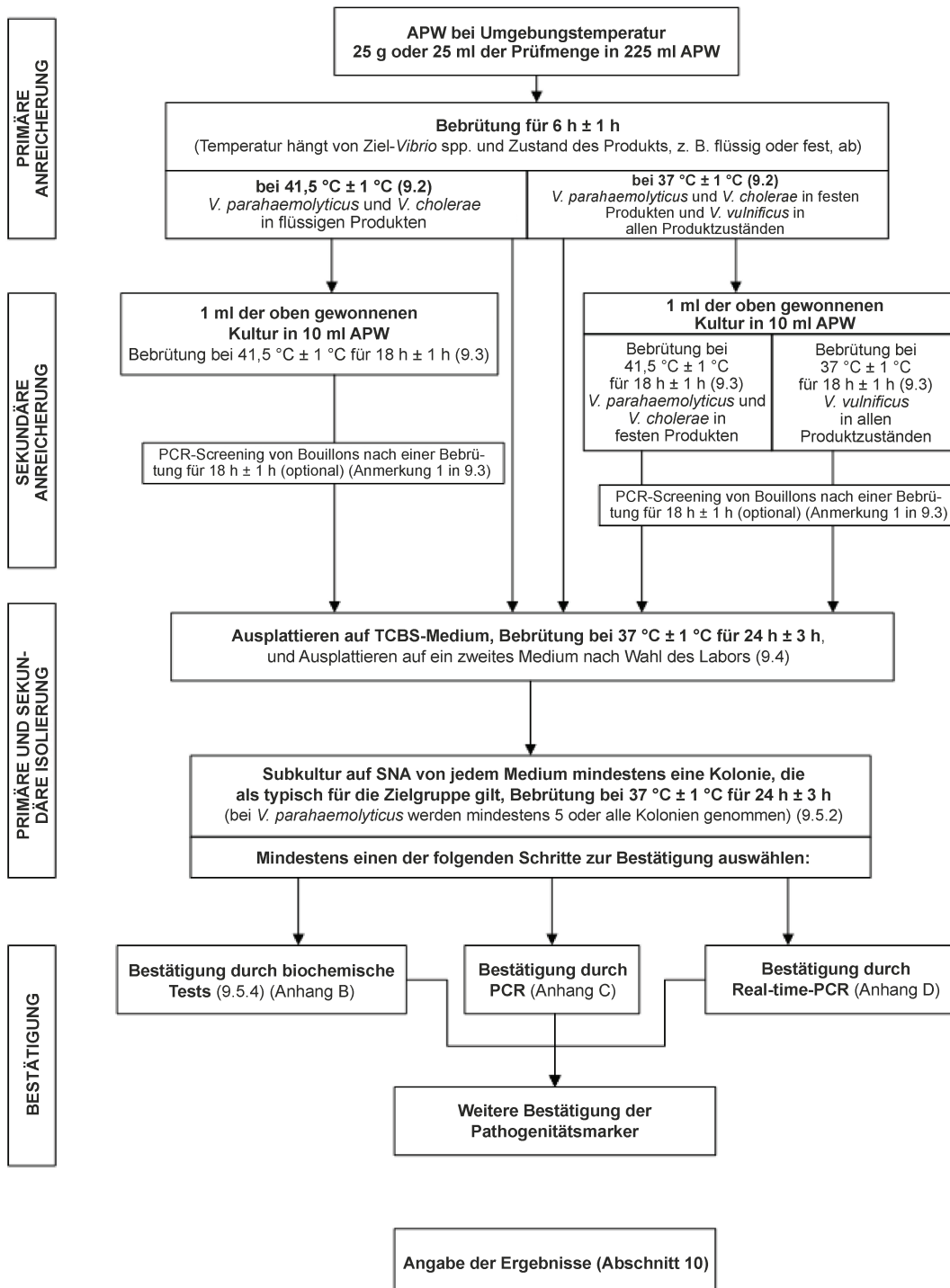


Bild A.1 — Fließschema des Verfahrens für den Nachweis von enteropathogenen *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus*

Anhang B (normativ)

Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien und Reagenzien

B.1 Einleitung

Bei der Herstellung und Leistung eines Nährmediums handelt es sich um einen grundlegenden Schritt, um die Integrität der mikrobiologischen Untersuchung sicherzustellen.

Werden Fertigmedien verwendet, sollten die Hersteller dieser verfügbaren Medien über ein Qualitätssicherungsprogramm nach EN ISO 11133:2014 verfügen, das die Qualität der von ihnen gelieferten Medien sicherstellt. Unter diesen Bedingungen braucht der Anwender/das Labor keine zusätzlichen Prüfungen an solchen Medien durchzuführen, er/es muss jedoch die Lagerungsbedingungen entsprechend den Empfehlungen der Hersteller sicherstellen.

Bei Verdünnungsmitteln und Medien, die vom Anwender/Labor direkt aus handelsüblichen Trockenformulierungen und/oder aus einzelnen Grundkomponenten hergestellt werden, sollte die Leistung dieser Verdünnungsmittel/Medien nach EN ISO 11133:2014 bewertet werden.

Wenn bekannt ist, dass antimikrobielle Verbindungen in der Formulierung der zu untersuchenden Probe vorhanden sind, wird die Verwendung eines Neutralisationsmittels in der Verdünnung/Bouillon empfohlen.

B.2 Wasser

Nach EN ISO 11133:2014, 4.3.3 darf für die folgende Zubereitung nur deionisiertes oder destilliertes oder durch Umkehrosmose hergestelltes Wasser oder Wasser von gleichwertiger Qualität (Qualität 3 nach EN ISO 3696:1995) verwendet werden, das frei von Substanzen ist, die das Wachstum der Mikroorganismen unter Prüfbedingungen voraussichtlich hemmen oder beeinflussen, z.B. Spuren von Chlor, Spuren von Ammoniak und Spuren von Metallionen. Die Leitfähigkeit des Wassers sollte vor der Verwendung überprüft werden.

Die mikrobielle Kontamination sollte nicht mehr als 10^3 koloniebildende Einheiten (KBE)/ml betragen und vorzugsweise unter 10^2 KBE/ml liegen.

B.3 Alkalisches Peptonwasser (APW)

B.3.1 Zusammensetzung

Pepton	20,0 g
Natriumchlorid	20,0 g
Wasser	1 000 ml

B.3.2 Herstellung

Die Bestandteile werden, bei Bedarf durch Erwärmen, im Wasser gelöst.

Der pH-Wert wird bei Bedarf so eingestellt, dass er nach dem Sterilisieren $8,6 \pm 0,2$ bei 25 °C beträgt.

Das Medium wird in für die Untersuchung erforderlichen Mengen abgefüllt.

Die Sterilisation erfolgt in einem Autoklav bei 121 °C für 15 min.

B.4 Thiosulfat-Citrat-Galle- und Saccharose-Agar (TCBS)

B.4.1 Zusammensetzung

Pepton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Natriumcitrat	10,0 g
Natriumthiosulfat	10,0 g
Eisen(III)-citrat	1,0 g
Natriumchlorid	10,0 g
Getrocknete Rindergalle	8,0 g
Saccharose	20,0 g
Bromthymolblau	0,04 g
Thymolblau	0,04 g
Agar-Agar	8,0 g bis 18,0 g ⁶
Wasser	1 000 ml

B.4.2 Herstellung

Die Bestandteile oder das vollständige Trockenmedium werden durch Kochen im Wasser gelöst.

Der pH-Wert wird bei Bedarf so eingestellt, dass er $8,6 \pm 0,2$ bei 25 °C beträgt.

Es wird nicht autoklaviert.

B.4.3 Herstellung der Agarplatten

15 ml bis 20 ml des Mediums, das auf etwa 50 °C abgekühlt wurde, werden in Petrischalen verteilt und bis zum Erstarren stehen gelassen.

B.5 Kochsalz-Nähragar (SNA)

B.5.1 Zusammensetzung

Fleischextrakt	5,0 g
Pepton	3,0 g
Natriumchlorid	10,0 g
Agar-Agar	8 g bis 18 g ⁷
Wasser	1 000 ml

B.5.2 Herstellung

Die dehydrierten Bestandteile oder das vollständige Trockenmedium werden, bei Bedarf durch Erwärmen, im Wasser gelöst.

⁶ Abhängig von der Gelfestigkeit des Agar-Agars.

⁷ Abhängig von der Gelfestigkeit des Agar-Agars.