

DIN EN 17715



ICS 65.080

Entwurf

Einsprüche bis 2023-07-05
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17715:2022-07

**Pflanzen-Biostimulanzien –
Nachweis von *Shigella* spp.;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17715:2023**

Plant biostimulants –
Detection of *Shigella* spp.;
German and English version prEN 17715:2023

Biostimulants des végétaux –
Détection de *Shigella* spp.;
Version allemande et anglaise prEN 17715:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-05-05 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 72 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17715:2023) 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 16140-1 siehe DIN EN ISO 16140-1

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 17715:2022-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

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

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

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

– *Entwurf* –

E DIN EN 17715:2023-06

– Leerseite –

Pflanzen-Biostimulanzien – Nachweis von Shigella spp.

Plant biostimulants – Detection of Shigella spp.

Biostimulants des végétaux – Détection de Shigella spp.

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 Anreicherung in einem selektiven flüssigen Medium	9
4.3 Ausplattieren und Erkennung der Kolonien	9
4.4 Biochemische und serologische Bestätigung	9
5 Nährmedien, Reagenzien und Antiseren	9
6 Geräte und Glasgeräte	10
7 Probenahme	10
8 Durchführung	10
8.1 Allgemeines	10
8.2 Prüfmenge	10
8.3 Anreicherung	10
8.3.1 Allgemeines	10
8.3.2 Flüssige Formulierungen	10
8.3.3 Feste Formulierungen	10
8.4 Ausplattieren und Kolonieauswahl	11
8.5 Bestätigung der Kolonien	11
8.5.1 Allgemeines	11
8.5.2 Anlegen der Reinkulturen	11
8.5.3 Biochemische Bestätigung	12
8.5.4 Weitere biochemische Differenzierung	15
8.6 Serologische Bestätigung	16
8.6.1 Antigendifferenzierung	16
8.6.2 Durchführung der Agglutinationsprüfungen	17
8.6.3 Endgültige Bestätigung	18
9 Angabe der Ergebnisse	18
10 Untersuchungsbericht	18
Anhang A (normativ) Fließschema des Prüfverfahrens	19
Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien und Reagenzien	20
B.1 Allgemeines	20
B.2 Selektive Anreicherungsbouillon	20
B.2.1 <i>Shigella</i> -Bouillon	20
B.2.2 Novobiocinlösung	20
B.2.3 Vollständiges Medium	21
B.3 Selektive Differentialagarmedien	21
B.3.1 MacConkey-Agar	21
B.3.2 Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar)	22
B.3.3 Hektoen-Enteric-Agar (HE-Agar)	22
B.4 Nähragar	23
B.4.1 Zusammensetzung	23
B.4.2 Herstellung	23
B.4.3 Herstellung der Nähragarplatten	24
B.5 Dreizucker-Eisen-Agar (TSI)	24
B.5.1 Zusammensetzung	24
B.5.2 Herstellung	24
B.6 Halbfester Nähragar	25

B.6.1	Zusammensetzung	25
B.6.2	Herstellung	25
B.7	Harnstoff-Agar (nach Christensen)	25
B.7.1	Grundnährboden	25
B.7.2	Harnstofflösung	26
B.7.3	Vollständiges Medium	26
B.8	L-Lysin-Decarboxylase-Bouillon	26
B.8.1	Zusammensetzung	26
B.8.2	Herstellung	26
B.9	L-Ornithin-Decarboxylase-Bouillon	27
B.10	Reagenzien für die Indolreaktion	27
B.10.1	Trypton/DL-Tryptophan-Medium	27
B.10.2	Kovacs-Indolreagenz	27
B.11	β -Galactosidase-Reagenz	27
B.11.1	Pufferlösung	27
B.11.2	ONPG-Lösung	28
B.11.3	Vollständiges Medium	28
B.12	Bromkresolpurpurbouillon	28
B.12.1	Zusammensetzung	28
B.12.2	Herstellung	28
B.13	Kochsalzlösung	29
B.13.1	Zusammensetzung	29
B.13.2	Herstellung	29
B.14	Natriumacetatagar	29
B.14.1	Zusammensetzung	29
B.14.2	Zusammensetzung	29
B.15	Citratagar nach Christensen	30
B.15.1	Zusammensetzung	30
B.15.2	Herstellung	30
B.16	Mucat-Bouillon	30
B.16.1	Prüfbouillon	30
B.16.2	Kontrollbouillon	31
B.17	Antiseren für <i>Shigella</i> -Spezies	31
Anhang C (normativ)	Beschreibung von Morphologie und Farbe von <i>Shigella</i> -Kolonien auf Selektivagarmedien zur Identifizierung und Qualitätskontrolle	32
Anhang D (informativ)	Ringversuch	33
D.1	Im Ringversuch verwendete Materialien	33
D.2	Ergebnisse des Ringversuchs	34
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	35
Literaturhinweise		36

Bilder

Bild A.1 — Fließschema des Prüfverfahrens	19
---	----

Tabellen

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien [1]	6
Tabelle 2 — Auswertung der Dreizucker-Eisen-Agar-Prüfung	12
Tabelle 3 — Biochemische Differenzierung und Bestätigung von <i>Shigella</i> -Spezies gegenüber <i>Escherichia coli</i> , <i>Hafnia</i> - und <i>Providencia</i> -Spezies	14

Tabelle 4 — Weitere biochemische Prüfungen ^a zur Differenzierung von <i>Shigella</i> spp. gegenüber Stämmen von <i>Escherichia coli</i>	16
Tabelle 5 — Antigendifferenzierung innerhalb der <i>Shigella</i> -Spezies	17
Tabelle C.1 — Beschreibung von Morphologie und Farbe von <i>Shigella</i> -Kolonien auf Selektivagarmedien	32
Tabelle D.1 — Probenarten, die im Ringversuch zum Nachweis von <i>Shigella</i> -Pathogenen untersucht wurden	33
Tabelle D.2 — Codes für Proben und hinzugefügte lyophilisierte Fläschchen, die mit dem Titer jedes Fläschchens geprüft wurden	33
Tabelle D.3 — Ergebnisse	34
Tabelle D.4 — Kontingenztafel für alle Proben	34
Tabelle ZA.1 — Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Verordnung (EU) 2019/1009	35

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17715:2023) 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 17715:2022 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.

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.

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 Komponentenkategorie 7 des Anhangs II der EU-Düngeprodukteverordnung angegeben.

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

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

Tabelle 1 — Agrarökologische Grundsätze und die Rolle von Biostimulanzien [1]

Erhöhung der Biodiversität
durch Verbesserung der Qualität/Quantität der Mikroorganismen im Boden.
Stärkung biologischer Regulations- und Wechselwirkungsmechanismen
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:
— z. B. Wachstum, Stoffwechsel, Pflanzenentwicklung
Verbesserung der biogeochemischen Kreisläufe
— Verbesserung der Aufnahme von Nährstoffelementen
— Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Nährstoffelementen 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 liefert ein Verfahren zum Nachweis, dass das Pathogen *Shigella* spp. in mikrobiellen Pflanzen-Biostimulanzien nicht in einer Konzentration vorhanden ist, die die jeweiligen Grenzwerte überschreitet, die in der EU-Düngeprodukteverordnung festgelegt sind.

Das Nachweisverfahren für *Shigella*-Pathogene ist nicht trennscharf, und eine Quantifizierung wird selten durchgeführt. Der Nachweis erfolgt in der Regel mit einem Anreicherungsmedium und anschließender Subkultivierung auf verschiedenen Selektivmedien.

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).

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

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

3 Begriffe

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

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

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

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

3.1

***Shigella* spp.**

Mikroorganismen, die typische Kolonien auf festen Selektivmedien bilden und bei Analyse nach diesem Dokument die beschriebenen morphologischen, physiologischen und biochemischen Merkmale besitzen

3.2

Nachweis von *Shigella* spp.

Feststellung der Anwesenheit oder Abwesenheit dieser Mikroorganismen in einer vorgegebenen Produktmasse bei der Untersuchung nach diesem Dokument

3.3

Ringversuch

Versuch, der von mehreren Laboratorien durchgeführt wird, in dem identische Proben zur gleichen Zeit untersucht werden und dessen Ergebnisse zur Schätzung der Leistungsparameter des alternativen Verfahrens verwendet werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Ziel eines Ringversuchs ist die Bestimmung der Variabilität der in verschiedenen Laboratorien unter Verwendung identischer Proben erhaltenen Ergebnisse.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.33]

1 In Vorbereitung.

2 In Vorbereitung.

3.4

Empfindlichkeit

Anzahl der als positiv ermittelten Proben dividiert durch die Anzahl der bei einem vorgegebenen Kontaminationsgrad untersuchten Proben

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Ergebnisse hängen somit vom Kontaminationsgrad der Probe ab.

3.5

Spezifität

Anzahl der als negativ ermittelten Proben dividiert durch die Anzahl der untersuchten Blindproben

3.6

positiver Vorhersagewert

PPV, en: positive predictive value

Verhältnis von positiven Proben, die als positiv identifiziert wurden, zu allen Proben mit positiven Untersuchungsergebnissen (einschließlich der fälschlicherweise als positiv identifizierten Proben)

3.7

negativer Vorhersagewert

NPV, en: negative predictive value

Verhältnis von negativen Proben, die als negativ identifiziert wurden, zu allen Proben mit negativen Untersuchungsergebnissen (einschließlich der fälschlicherweise als negativ identifizierten Proben)

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Der Nachweis von *Shigella* spp. wird in Übereinstimmung mit den entsprechenden Abschnitten von EN ISO 21567:2004 und mit den folgenden vier aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt (siehe Anhang A, Bild A.1).

4.2 Anreicherung in einem selektiven flüssigen Medium

Shigella-Bouillon, die 0,5 µg/ml Novobiocin enthält, wird mit einer Prüfmenge beimpft und anschließend unter anaeroben Bedingungen für 16 h bis 20 h bei $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet.

4.3 Ausplattieren und Erkennung der Kolonien

Aus der erhaltenen Anreicherungskultur werden drei selektive Differenzierungsmedien beimpft: MacConkey-Agar mit niedriger Selektivität; XLD-Agar mit mäßiger Selektivität und Hektoen-Agar (Hektoen enteric agar) mit höchster Selektivität. Die Bebrütung dieser Selektivagarmedien erfolgt für 20 h bis 24 h bei 37°C .

4.4 Biochemische und serologische Bestätigung

Von jedem der drei Selektivagarmedien werden typische und verdächtige Kolonien ausgewählt. Von den Kolonien werden auf Nähragar Reinkulturen angelegt. Es folgt die biochemische und serologische Charakterisierung mithilfe der beschriebenen Prüfungen.

5 Nährmedien, Reagenzien und Antiseren

Falls nicht anders festgelegt, werden nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und destilliertes oder entmineralisiertes Wasser oder Wasser gleichwertiger Reinheit verwendet.

Die zu verwendenden Medien, Reagenzien und Antiseren werden in Anhang B beschrieben.

In der Regel sollten kommerziell erhältliche Trockennährböden beständigere Ergebnisse erbringen als die im Labor aus ihren Bestandteilen hergestellten. Bei ihrer Anwendung ist den Anweisungen des Herstellers zu folgen.

gen, weil kleine Veränderungen bei der Herstellung die Leistung der Selektivmedien stark verändern können. Übermäßiges Erwärmen der in diesem Dokument verwendeten Selektivagarböden durch Autoklavieren, Lagerung und erneutes Erwärmen für die Verwendung kann zum Verlust der Selektivität führen.

6 Geräte und Glasgeräte

Einweggeräte mit geeigneten Kennwerten sind eine zulässige Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

Es ist die übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Labors nach EN 17708:—¹ anzuwenden.

7 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Teil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens (siehe die spezifische Europäische Norm, die sich auf das betreffende Produkt bezieht, EN 17702-1:—³).

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

8 Durchführung

8.1 Allgemeines

Bewertet wird die Anwesenheit oder Abwesenheit von *Shigella*-Pathogenen in mindestens 25 g oder 25 ml des zu prüfenden Produkts.

8.2 Prüfmenge

Siehe den entsprechenden Teil von EN 17708:—¹.

8.3 Anreicherung

8.3.1 Allgemeines

Eine repräsentative Probe des zu prüfenden Produkts wird nach folgendem Verfahren hergestellt, das die verschiedenen Formulierungen von Produkten auf Basis von Biostimulanzen berücksichtigt.

8.3.2 Flüssige Formulierungen

25 g der Probe werden in 225 ml sterile *Shigella*-Bouillon, die 0,5 µg/ml Novobiocin (B.2.2) enthält, gegeben. Kurz darauf wird die gesamte Suspension entnommen und dann unter anaeroben Bedingungen bei $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 16 h bis 20 h bebrütet.

8.3.3 Feste Formulierungen

25 g der Probe werden in 225 ml sterile *Shigella*-Bouillon, die 0,5 µg/ml Novobiocin (B.2.2) enthält, gegeben. Kurz darauf wird die gesamte Suspension entnommen und in einem Stomacher für 2 min bei höchster Drehzahl vermischt.

Die *Shigella*-Bouillon wird unter anaeroben Bedingungen bei $(41,5 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 16 h bis 20 h bebrütet.

³ In Vorbereitung.

8.4 Ausplattieren und Kolonieauswahl

8.4.1 Die Bouillon mit den nach 8.3 erhaltenen Kulturen wird vorsichtig von Hand durchmischt und das Absetzen der größeren Teilchen abgewartet.

Mittels einer Öse werden die Oberflächen von den folgenden Selektivagarmedien so beimpft, dass gut voneinander getrennte Kolonien entstehen: MacConkey-Agar (B.3.1) mit niedriger Selektivität; XLD-Agar (B.3.2) mit mäßiger Selektivität und Hektoen-Agar (B.3.3) mit höchster Selektivität.

8.4.2 Die Platten werden zwischen 20 h und 24 h bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet.

Das Aussehen unterschiedlicher *Shigella*-Spezies kann auf dem gleichen Selektivagar variieren. Zur Beschreibung von *Shigella*-Kolonien auf den unterschiedlichen verwendeten Selektivagarmedien siehe Anhang C.

Alle typischen oder verdächtigen Kolonien auf jeder Platte werden markiert.

Wenn keine typischen Kolonien zu sehen sind und das Wachstum der anderen Mikroorganismen schwach ist, werden die Platten für weitere 24 h erneut bebrütet. Die Platten werden erneut auf die typischen *Shigella*-Kolonien untersucht.

Das Bestätigungsverfahren wird wie in 8.5 beschrieben durchgeführt.

8.5 Bestätigung der Kolonien

8.5.1 Allgemeines

(Derzeit im Handel erhältliche) Identifizierungskits dürfen verwendet werden, wenn vom Anwender nachgewiesen wurde, dass sie für die Identifizierung der unterschiedlichen Spezies von *Shigella* geeignet sind. Die Anweisungen des Herstellers sind zu befolgen.

Zur Bestätigung werden von fünf markierten oder verdächtigen Kolonien aus jeder Platte jedes Selektivmediums (siehe 8.4) Subkulturen hergestellt.

Falls auf einer Platte weniger als fünf typische oder verdächtige Kolonien vorhanden sind, werden alle markierten Kolonien zur Bestätigung entnommen.

Für die biochemische und serologische Bestätigung werden Reinkulturen verwendet.

8.5.2 Anlegen der Reinkulturen

Die ausgewählten Kolonien werden auf der Oberfläche von Nähragarplatten (Abschnitt B.4) so ausgestrichen, dass sich gut voneinander getrennte Kolonien entwickeln können. Die beimpften Platten werden 18 h bis 24 h bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet.

Falls Mischkulturen vorliegen, wird die verdächtige Kolonie auf einer weiteren Nähragarplatte subkultiviert und 18 h bis 24 h bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet, um die Reinkultur zu erhalten.

Shigella sonnei kann auf der gleichen Agarplatte zwei Kolonietypen ergeben: glatte runde und erhabene Kolonien (Phase 1) und ebene unregelmäßige Kolonien mit matter Oberfläche (Phase 2).

ANMERKUNG Es ist möglich, zuerst die charakteristischste Kolonie von jeder selektiven Agarplatte zu untersuchen. Falls diese positiv ist, ist es nicht notwendig, weitere Kolonien zu prüfen. Ist sie negativ, wird mit den anderen ausgewählten Kolonien fortgesetzt, bis entweder alle negativ sind oder eine positive gefunden wird.

8.5.3 Biochemische Bestätigung

8.5.3.1 Allgemeines

Die unter 8.5.3.2 bis 8.5.3.9 festgelegten Medien werden mithilfe einer Impfnadel mit jeder der nach 8.5.1 ausgewählten Kulturen beimpft und alle Ergebnisse werden aufgezeichnet.

8.5.3.2 Dreizucker-Eisen-Agar (TSI-Schrägagar) (Abschnitt B.5)

Der Schrägagar ist durch Ausstrich und die Hochschicht durch *Stichkultur* zu beimpfen.

Es wird (24 ± 3) h bei (37 ± 1) °C bebrütet.

Die Veränderungen im Medium werden wie in Tabelle 2 bewertet:

Tabelle 2 — Auswertung der Dreizucker-Eisen-Agar-Prüfung

Bereich des Schrägagars	Aussehen	Hinweis auf
Hochschicht	gelb rot oder unverändert schwarz Bläschen oder Risse	Glucose fermentiert: positiv Glucose nicht fermentiert: negativ Bildung von Schwefelwasserstoff: positiv Gasbildung
Schrägagar	gelb rot oder unverändert	Lactose und/oder Saccharose im Stoffwechsel abgebaut: positiv Lactose und Saccharose im Stoffwechsel nicht abgebaut: negativ

Typische *Shigella*-Kulturen zeigen eine gelbe Hochschicht (Säurebildung) und keine Gasbläschen; es liegt keine Veränderung der Farbe des Schrägagars vor (kein Abbau von Lactose oder Saccharose im Stoffwechsel) und keine Schwefelwasserstoffbildung (siehe Tabelle 3).

8.5.3.3 Halbfester Nähragar für die Beweglichkeitsprüfung (Abschnitt B.6)

Der halbfeste Nähragar wird mit einer Impfnadel mit einer Kolonie als Stichkultur beimpft.

Die Kultur wird 18 h bis 24 h bei (37 ± 1) °C bebrütet.

Der Impfstrich wird auf Wachstum untersucht. Unbewegliche Mikroorganismen ergeben eine diskrete Linie; bewegliche Stämme zeigen ein diffuses Wachstum vom Impfstrich ausgehend.

Alle *Shigella*-Spezies sind unbeweglich.

8.5.3.4 Harnstoff-Agar (Abschnitt B.7)

Der Ausstrich erfolgt auf der Agaroberfläche.

Es wird (24 ± 3) h bei (37 ± 1) °C bebrütet. Die Kultur wird in Abständen untersucht.

Bei der Hydrolyse von Harnstoff entwickelt sich eine rosa bis tief kirschrote Farbe, bedingt durch die Freisetzung von Ammoniak aus dem Harnstoff mit einem Farbumschlag des pH-Indikators. Bei einer negativen Reaktion ergibt sich keine Farbveränderung des Agars.

Shigella-Spezies hydrolysieren Harnstoff nicht.

8.5.3.5 L-Lysin-Decarboxylase-Medium (Abschnitt B.8)

Es wird unterhalb der Oberfläche der flüssigen Bouillon beimpft. Es wird (24 ± 3) h bei (37 ± 1) °C bebrütet.

Bei einem positiven Untersuchungsergebnis entwickelt sich eine trübe und purpurne Färbung. Bei gelber Färbung ist das Ergebnis negativ.

Shigella-Spezies decarboxylieren Lysin nicht.

ANMERKUNG Eine Überziehung mit Paraffin im Röhrchen kann zur Sicherung anaerober Bedingungen dienen.

8.5.3.6 L-Ornithin-Decarboxylase-Medium (Abschnitt B.9)

Es wird unterhalb der Oberfläche der flüssigen Bouillon beimpft. Es wird (24 ± 3) h bei (37 ± 1) °C bebrütet.

Bei einem positiven Untersuchungsergebnis entwickelt sich eine purpurne Färbung. Bei gelber Färbung ist das Ergebnis negativ.

Shigella sonnei decarboxyliert Ornithin, aber andere *Shigella*-Spezies nicht (Tabelle 3).

8.5.3.7 Nachweis der Indolbildung (Abschnitt B.10)

Ein Röhrchen mit 5 ml Trypton/Tryptophan-Medium (B.10.1) wird mit der Reinkultur beimpft.

Es wird (24 ± 3) h bei (37 ± 1) °C bebrütet.

Nach der Bebrütung wird 1 ml Kovacs-Reagenz (B.10.2) zugegeben.

Die Bildung eines roten Rings innerhalb von 10 min zeigt Indolbildung an und eine gelbe bis braune Farbe eine negative Reaktion.

Shigella sonnei ist negativ, während andere Stämme unterschiedliche Reaktionen zeigen (siehe Tabelle 1).

8.5.3.8 Nachweis von β -Galactosidase (Abschnitt B.11)

Eine Öse der Reinkultur vom Nähragar wird in einer Schraubverschlussflasche oder einem Röhrchen in 0,25 ml Kochsalzlösung (Abschnitt B.12) aufgeschwemmt.

Es wird ein Tropfen Toluol zugegeben und der Ansatz durch Schütteln gut durchgemischt.

Das Röhrchen wird in einen auf 37 °C eingestellten Brutschrank gestellt und dort mehrere Minuten belassen. 0,25 ml vollständiges Reagenz werden zugegeben und es wird durchmischt.

Der Ansatz wird wieder in den Brutschrank bei 37 °C gestellt und dort (24 ± 3) h belassen, wobei die Kultur in Abständen untersucht wird.

Eine gelbe Färbung zeigt die Bildung von β -Galactosidase an, die bereits in 20 min erfolgen kann.

Shigella sonnei ist positiv. *S. dysenteriae* und *S. boydii* zeigen unterschiedliche Reaktionen und *S. flexneri* ist negativ (siehe Tabelle 1).

8.5.3.9 Verwertung von Kohlenhydraten (Bromkresolpurpurbouillon) (Abschnitt B.12)

Jedes der hergestellten Kohlenhydrat-Medien wird mit einem geringen Inokulum beimpft.

Es wird (24 ± 3) h bei (37 ± 1) °C bebrütet.

Eine positive Reaktion bei Verwertung eines Kohlenhydrats ergibt einen Farbumschlag des pH-Indikators von purpurfarben zu gelb.

Zu den Reaktionen unterschiedlicher *Shigella*-Spezies siehe Tabelle 3.

8.5.3.10 Interpretation der biochemischen Ergebnisse

Stämme innerhalb einiger *Shigella*-Spezies zeigen Abweichungen in ihren biochemischen Reaktionen (siehe Tabelle 3). Deshalb ist eine sich nur auf biochemische Ergebnisse begründende Interpretation schwierig und die Serotypisierung von wesentlicher Bedeutung, um die Identität festzustellen.

Shigella sind gramnegative Stäbchen von der Größe 2 µm bis 4 µm × 0,5 µm. Sie zeigen aber häufig eine Tendenz zu kürzeren kokkoiden Formen und bilden im typischen Fall kein Gas aus Glucose. Sie sind unbeweglich, erzeugen keinen Schwefelwasserstoff und decarboxylieren Lysin nicht. Sie sind nach 24 h Lactose-negativ. Die weiteren oben beschriebenen Prüfungen ergeben abweichende Reaktionen oder unterschiedliche Reaktionen je nach der Spezies.

Innerhalb der Gattung *Shigella* ist *Shigella dysenteriae* durch Mannit (negativ) von anderen Spezies zu differenzieren. Durch die L-Ornithindecarboxylierung wird *Shigella sonnei* (positiv) von den anderen Spezies differenziert.

Tabelle 3 — Biochemische Differenzierung und Bestätigung von *Shigella*-Spezies gegenüber *Escherichia coli*, *Hafnia*- und *Providencia*-Spezies

Prüfung	<i>Escherichia coli</i>	<i>Hafnia</i> -Spezies	<i>Providencia</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella boydii</i>
H ₂ S aus TSI-Agar	—	—	—	—	—	—	—
Gas aus Glucose (TSI)	+	V	+	—	—	e	e
Beweglichkeit	+	V	V	—	—	—	—
Urease	—	—	V	—	—	—	—
L-Lysin-Decarboxylase	V	+	—	—	—	—	i
L-Ornithin-Decarboxylase	V	+	—	+	—	—	—
Indolbildung	+	—	+	—	V ^d (61 %)	V ^d (44 %)	V ^d (29 %)
β-Galactosidase	+	V	—	+ (95 %)	—	V ^f (50 %)	V ^f (11 %)
Säure aus							
Dulcit	V	V	—	—	V ^g (9,4 %)	V ^g (4,5 %)	V ^g (6,7 %)
Glucose	+	+	—	+ (100 %)	+ (100 %)	+ (100 %)	+ (100 %)
Lactose	V	V	—	c	a	—	a
Mannit	+	+	V	+ (99 %)	+ ^b (94 %)	—	+ (98 %)
Melibiose	V	V	V	—	V	V	V
Raffinose	V	V	—	− ^c (2,5 %)	V (53 %)	—	—
Salicin	V	V	—	—	—	—	—
Sorbit	+	—	—	—	V (31 %)	V (29 %)	V (42 %)
Saccharose	V	—	V	− ^c (1,5 %)	—	—	—

Tabelle 3 (fortgesetzt)

Prüfung	<i>Escherichia coli</i>	<i>Hafnia</i> -Spezies	<i>Providencia</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Shigella boydii</i>
Xylose	+	+	—	—	—	V ^h (4,0 %)	V (57 %)
V Die Stämme zeigen Abweichungen innerhalb von oder zwischen unterschiedlichen Serovaren einer Spezies; wo es angegeben ist (x %), wird dadurch der Prozentsatz der positiven Stämme angezeigt⁴. a Einige Stämme von <i>S. flexneri</i> Serovar 2a und <i>S. boydii</i> 9 erzeugen Säure. b Einige Stämme von <i>S. flexneri</i> Serovare 4 und 6b erzeugen keine Säure. c <i>Shigella sonnei</i> erzeugt Säure nach einigen Tagen Bebrütung. d Einige Serotypen von <i>Shigella dysenteriae</i> und <i>S. flexneri</i> Serovar 6 und <i>S. boydii</i> sind negativ. e Stämme von <i>S. flexneri</i> und <i>S. boydii</i> Serovare 13 und 14 erzeugen Säure und Gas. f Stämme von <i>S. dysenteriae</i> Serovar 1 und <i>S. boydii</i> Serovar 13 sind immer positiv. g Stämme von <i>S. dysenteriae</i> Serovar 5 und <i>S. flexneri</i> Serovar 6 sind positiv. h Stämme von <i>S. dysenteriae</i> Serovare 8 und 10 sind positiv und 4 und 6 sind variabel. i Nur Stämme von <i>S. boydii</i> Serovar 13 sind positiv.							

8.5.4 Weitere biochemische Differenzierung

8.5.4.1 Allgemeines

Einige Stämme von *Shigella*-Spezies sind Stämmen von *Escherichia coli* ähnlich. Deshalb sollten zusätzliche biochemische Prüfungen zur Differenzierung durchgeführt werden.

8.5.4.2 Natriumacetat

Die Schrägfläche des Natriumacetatmediums (Abschnitt B.13) wird mit der Reinkultur (8.5.2) beimpft. Es ist ein glatter Impfdraht zu verwenden, um die Menge des mit dem Inokulum übertragenen Nährmediums auf ein Mindestmaß zu reduzieren. Oder es ist eine Impfnadel zu verwenden.

Es wird 2 Tage bei (37 ± 1) °C unter aeroben Bedingungen bebrütet.

Das grüne Medium wird auf Wachstum untersucht. Bei einem positiven Ergebnis schlägt die Farbe des Mediums nach Blau um. Es wird auf Wachstum geprüft. Eine blaue Färbung zeigt eine positive Reaktion an.

Liegt kein Wachstum vor, wird die Kultur weitere 2 Tage bei (37 ± 1) °C bebrütet und erneut untersucht.

Shigella-Spezies wachsen nicht oder nur sehr gering. Stämme von *E. coli* sind blaue Kolonien, umgeben von einem Medium mit blaugrüner Färbung.

8.5.4.3 Citratagar nach Christensen

Die Schrägfläche des Citratmediums (Abschnitt B.14) wird mit einer Impfnadel mit der Reinkultur (8.4.1) beimpft. Die Menge des mit dem Inokulum übertragenen Mediums ist auf ein Mindestmaß zu reduzieren.

4 Von Ewing, W.H. und Lindberg, A.A. Serology of the Shigella. In: Methods in Microbiology (Ed. Bergan T.), Band 14, Academic Press, 1984.

Es wird 2 Tage bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ aerob bebrütet.

Das Medium wird auf cremig-rosafarbenes Wachstum untersucht. Bei Wachstum schlägt die Farbe des Mediums nach Rot um.

Liegt kein Wachstum vor, wird die Kultur weitere 2 Tage bebrütet und danach erneut untersucht.

Shigella-Spezies wachsen nicht.

8.5.4.4 Natriummucat

Die Bouillons zur Prüfung (B.15.1) und zur Kontrolle (B.15.2) werden mit der Reinkultur (8.4.1) beimpft. Es wird 2 Tage bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ aerob bebrütet.

Das Medium wird auf Wachstum und Farbentwicklung untersucht. Bei blauer Färbung ist das Ergebnis negativ, bei gelb strohfarbener Färbung ist das Ergebnis positiv.

Liegt kein Wachstum im zu untersuchenden Medium vor, wird die Kultur weitere 2 Tage bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet und erneut untersucht.

Shigella sonnei zeigt variable Reaktionen, andere *Shigella*-Spezies sind jedoch negativ.

Weitere Einzelheiten zu Reaktionen der unterschiedlichen *Shigella*-Spezies sind in Tabelle 4 beschrieben.

Tabelle 4 — Weitere biochemische Prüfungen^a zur Differenzierung von *Shigella* spp. gegenüber Stämmen von *Escherichia coli*

Spezies	Biochemische Reaktionen (Wachstum) nach Bebrütung über den angegebenen Zeitraum					
	Natriumacetat		Citratagar nach Christensen		Natriummucat	
	+ % nach 2 Tagen	+ % nach weiteren 2 Tagen	+ % nach 2 Tagen	+ % nach weiteren 2 Tagen	+ % nach 2 Tagen	+ % nach weiteren 2 Tagen
<i>S. dysenteriae</i>	– (0)	– (0)	– (0)	– (0)	– (0)	– (0)
<i>S. flexneri</i>	– (0)	– (0)	– (0)	– (0)	– (0)	– (0)
<i>S. boydii</i>	– (0)	– (0)	– (0)	– (0)	– (0)	– (0)
<i>S. sonnei</i>	– (0)	– (0)	– (0)	– (0)	V (6,4)	V (36,7)
<i>E. coli</i>	V (83,8)	+ (93,5)	V (> 15,3)	V (> 34,2)	+ (91,6)	+ (93,0)
+ > 90 % der Stämme positiv.						
– > 90 % der Stämme negativ.						
V Variable Ergebnisse zwischen 10 % und 89 % positiver Stämme.						
% Prozentsatz der positiven Stämme nach der angegebenen Bebrütungsdauer.						
^a Aus <i>Bacteriological Analytical Manual</i> , 8th Edition (überarbeitet 1997), FDA, USA.						

8.6 Serologische Bestätigung

8.6.1 Antigendifferenzierung

Shigella-Spezies sind unbeweglich und besitzen deshalb keine Geißelantigene. Die Differenzierung innerhalb der Spezies und zwischen den Spezies hängt von der Analyse der einzelnen somatischen „O“-Gruppen und des

spezifischen „O“-Typenantigens (siehe Tabelle 5) ab. Die Typisierung bis zur Ebene der Serovar wird vorzugsweise durch ein Referenzlabor für infektiöse Darmerkrankungen durchgeführt.

Das Wachstum einer frischen Kultur auf Nähragar ist erforderlich (8.5.2). Die Agglutinationsversuche werden auf sauberen Objektträgern aus Glas oder Glasplatten (Abschnitt 6) mit geeigneter Größe durchgeführt.

Tabelle 5 — Antigendifferenzierung innerhalb der *Shigella*-Spezies

<i>Shigella</i> -Spezies	Antigengruppe	Serovare (spezifische Antigenbezeichnung)
<i>S. dysenteriae</i>	A	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13
<i>S. flexneri</i>	B	1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, X, Y
<i>S. boydii</i>	C	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
<i>S. sonnei</i>	D	1

Die Gruppenantigene (A, B, C, D) können Unterantigene enthalten, die eine Kreuzreaktion mit anderen Gruppenantigenen auslösen können. Dies wird durch die Verwendung adsorbierter Antiseren und/oder deren Verdünnung auf eine festgelegte Konzentration verhindert. Einige Spezies, besonders *Shigella dysenteriae*, haben Hüllenantigene, die die Gruppen- und Serovarianten maskieren und so die Agglutination mit spezifischen Typenantiseren verhindern. Das Hüllenantigen wird durch Erwärmen einer Suspension auf 100 °C für 15 min bis 60 min beseitigt.

ANMERKUNG Das Gruppenantigen D von *Shigella sonnei* ist bei Kolonien sowohl von Glatt- als auch Rauformen vorhanden und zeigt keine Kreuzreaktion mit den anderen Gruppenantigenen von *Shigella*. Anders als bei einigen anderen Enterobacteriaceae zeigen die Rauformen von *S. sonnei* nicht unbedingt eine Autoagglutination. *Shigella sonnei* hat kein Hüllantigen.

8.6.2 Durchführung der Agglutinationsprüfungen

Die vom Hersteller gegebenen Anweisungen für die Zubereitung der Antiseren und die Durchführung der Agglutinationsprüfungen sind zu befolgen.

Ein Tropfen Gruppenantiserum und ein Tropfen Kochsalzlösung (Abschnitt B.12) werden getrennt auf einen Objektträger (6.13) gegeben. Jeweils ein Anteil der zu untersuchenden Kolonie wird in der Kochsalzlösung und in der Antiserumlösung verteilt, sodass in beiden eine homogene und trübe Suspension entsteht.

Der Objektträger wird 30 s bis 60 s vorsichtig hin und her bewegt.

Das Ergebnis wird gegen einen dunklen Hintergrund betrachtet, falls erforderlich, mithilfe eines Vergrößerungsglases.

Wenn die Bakterien im Antiserum zu mehr oder weniger deutlichen Einheiten zusammengeklumpt sind und in der Kochsalzlösung keine Agglutination vorliegt, ist das Isolat für die geprüfte Gruppe positiv. Wenn in der Kochsalzlösung eine Agglutination vorliegt, wird der Stamm als autoagglutinierend angesehen und darf nicht weiter verwendet werden. Es sollte dann die Prüfung anderer Kolonien aus der gleichen Kultur und aus den anderen Isolaten, die vom ursprünglichen Selektivagar zur Untersuchung ausgewählt wurden und auf *Shigella* hinweisende biochemische Reaktionen zeigten, erfolgen. Wenn alle ausgewählten Kolonien autoagglutinieren, ist ein Referenzlabor für infektiöse Darmerkrankungen zur Identifizierung der Isolate hinzuzuziehen.

Wenn alle Untersuchungen negativ und die Ergebnisse der biochemischen Untersuchung für *Shigella* charakteristisch sind, wird eine Aufschwemmung der Reinkulturen im Wasserbad bei 100 °C für 60 min erwärmt. Die Durchführung der Agglutinationsprüfung wird wiederholt.

8.6.3 Endgültige Bestätigung

Zur Bestätigung und zur Untersuchung über den „Gruppenfaktor“ hinaus (siehe Tabelle 5) sollten die Isolate einem anerkannten Referenzlabor für infektiöse Darmerkrankungen zur Bestätigung und endgültigen Typisierung übergeben werden.

Der Sendung müssen alle die Isolate betreffenden Informationen beigelegt werden.

9 Angabe der Ergebnisse

Entsprechend den Ergebnissen der Auswertung wird die Anwesenheit oder Abwesenheit bestätigter *Shigella*-Spezies in der Prüfmenge von x g oder x ml des Produkts angegeben (mindestens 25 g).

10 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss folgende Informationen enthalten:

- falls bekannt, das angewendete Probenahmeverfahren;
- die Größe der Prüfmenge und/oder die Art des untersuchten Objekts;
- das angewendete Prüfverfahren mit Verweisung auf dieses Dokument (EN 17715:—);
- jede Abweichung in den Anreicherungsmedien oder den verwendeten Bebrütungsbedingungen;
- alle in diesem Dokument nicht festgelegten oder als optional angesehenen Betriebsbedingungen, einschließlich Einzelheiten zu allen Zwischenfällen, die die Prüfergebnisse beeinflusst haben könnten;
- die Prüfergebnisse.