

DIN EN 17717



ICS 65.080

Entwurf

Einsprüche bis 2023-07-05
Vorgesehen als Ersatz für
DIN CEN/TS 17717:2022-07

**Pflanzen-Biostimulanzien –
Nachweis von Salmonella spp.;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17717:2023**

Plant biostimulants –
Detection of Salmonella spp.;
German and English version prEN 17717:2023

Biostimulants des végétaux –
Détection de Salmonella spp.;
Version allemande et anglaise prEN 17717:2023

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 52 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17717:2023) 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 17717:2022-07 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.

Pflanzen-Biostimulanzien – Nachweis von Salmonella spp.

Plant biostimulants – Detection of Salmonella spp.

Biostimulants des végétaux – Détection de Salmonella spp.

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	7
4.1 Allgemeines	7
4.2 Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium	7
4.3 Ausplattieren auf festen Selektivmedien	7
4.4 Bestätigung	7
5 Nährmedien, Reagenzien, Antiseren	8
5.1 Allgemeines	8
5.2 Chromogener Isolierungsagar	8
5.3 Nicht-selektiver Agar	8
5.4 Selektiver Bestätigungs-Agar	8
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien	8
7 Probenahme	9
8 Herstellung der Untersuchungsprobe	9
9 Durchführung	10
9.1 Prüfmenge und Erstverdünnung	10
9.2 Selektive Anreicherung	10
9.3 Isolierung	10
9.4 Bestätigung	10
9.4.1 Allgemeines	10
9.4.2 Auswahl von Kolonien für die Bestätigung	11
9.4.3 Serologische Untersuchung	11
9.4.4 Selektivmedium für die H ₂ S-Bildung	12
9.4.5 Serotypisierung	12
10 Angabe der Ergebnisse	13
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens	13
11.1 Ringversuche	13
11.2 Empfindlichkeit	13
11.3 Spezifität	13
11.4 Positiver Vorhersagewert (PPV, en: positive predictive value)	13
11.5 Negativer Vorhersagewert (NPV, en: negative predictive value)	14
12 Untersuchungsbericht	14
Anhang A (normativ) Fließschema der Verfahren	15
Anhang B (normativ) Nährmedien und Reagenzien	16
B.1 Allgemeines	16
B.2 Gepuffertes Peptonwasser (BPW)	16
B.2.1 Zusammensetzung	16
B.2.2 Herstellung	16
B.3 Novobiocinlösung	17
B.3.1 Zusammensetzung	17
B.3.2 Herstellung	17
B.4 Nähragar (Beispiel für ein nicht-selektives Medium)	17
B.4.1 Zusammensetzung	17
B.4.2 Herstellung	17
B.4.3 Herstellung der Nähragarplatten	17
B.5 Dreizucker-Eisen-Agar (TSI-Agar; Beispiel für Agar zur Bildung von H ₂ S)	18
B.5.1 Zusammensetzung	18

B.5.2	Herstellung	18
B.6	Kochsalzlösung	18
B.6.1	Zusammensetzung	18
B.6.2	Herstellung	18
B.7	Antiseren	19
B.8	Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien	19
Anhang C (informativ)	Beispiele für selektive Ausstreichmedien	20
Anhang D (informativ)	Validierungsstudie und Leistungsmerkmale des Verfahrens	22
D.1	Im Ringversuch verwendete Materialien	22
D.2	Ergebnisse des Ringversuchs	22
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	24
Literaturhinweise		25

Bilder

Bild 1	— Interpretation der biologischen und serologischen Ergebnisse	13
Bild A.1	— Fließschema des Verfahrens zum Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. in Pflanzen-Biostimulanzien	15

Tabellen

Tabelle 1	— Interpretation der Bestätigungsuntersuchungen	12
Tabelle B.1	— Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien	19
Tabelle C.1	— Beispiele für chromogene Isolierungsmedien für die Angabe der C8-Esterase-Aktivität	20
Tabelle C.2	— Beispiele für Selektivmedien zur Bestätigung, die die Bildung von H ₂ S hervorheben	20
Tabelle D.1	— Materialien, die im Ringversuch zum Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. in Pflanzen-Biostimulanzien untersucht wurden	22
Tabelle D.2	— Ergebnisse des Ringversuchs zum Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. in Pflanzen-Biostimulanzien	23
Tabelle D.3	— Kontingenztafel zum Ringversuch zum Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. in Pflanzen-Biostimulanzien	23
Tabelle ZA.1	— Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und der Verordnung (EU) 2019/1009	24

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17717:2023) 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 17717:2022 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 Pflanzen-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 Komponentenmaterialkategorie 7 des Anhangs II der EU-Düngeprodukteverordnung (EU) 2019/1009 [1] angegeben.

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

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 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. in Biostimulanzien der folgenden Produktfunktionskategorien (PFCs, en: Product Function Categories) und Komponentenmaterialkategorien (CMC, en: Component Material Category) von EU-Düngeprodukten, wie in der Verordnung (EU) 2019/1009 des Europäischen Parlaments und des Rates [1] beschrieben:

- PFC 6(A): Mikrobielles Pflanzen-Biostimulans;
- PFC 6(B): Nicht-mikrobielles Pflanzen-Biostimulans;
- CMC 7: Mikroorganismen.

Es erfordert drei aufeinanderfolgende Schritte: eine selektive Anreicherung, eine Isolierung auf einem chromogenen Agar und bei positivem Befund eine Bestätigung mit einer serologischen Untersuchung (und, falls erforderlich, einem Selektivmedium).

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*

EN ISO 7218:2007³, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen (ISO 7218:2007)*

EN ISO 11133:2014⁴, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien (ISO 11133:2014)*

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

***Salmonella* spp.**

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

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

3.2

Nachweis von *Salmonella* spp.

Bestimmung der Anwesenheit oder Abwesenheit von *Salmonella* spp. (3.1) in 25 g oder 25 ml des Produkts, wenn die Untersuchungen nach diesem Dokument durchgeführt werden

3.3

Laborprobe

Probe, die für die Untersuchung oder Prüfung im Labor vorgesehen ist

3.4

Untersuchungsprobe

aus der Laborprobe bereitete Probe, aus der Prüfmengen genommen werden

3.5

Prüfmenge

Menge eines Materials, die aus der Untersuchungsprobe (bzw., falls beide die gleichen sind, aus der Laborprobe) entnommen wurde und an der die Untersuchung oder Begutachtung vorgenommen wird

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Der Nachweis von *Salmonellen* erfordert drei aufeinanderfolgende Schritte nach Anhang A. Die drei Schritte sind die selektive Anreicherung, die Isolierung auf einem chromogenen Agar und die Bestätigung mit einer serologischen Untersuchung (und, falls erforderlich, einem Selektivmedium).

ANMERKUNG *Salmonellen* können in geringer Anzahl vorhanden sein und werden oft von einer wesentlich größeren Anzahl anderer Bakterien wie *Enterobacteriaceae* oder anderer Familien begleitet. Die Anreicherung wird verwendet, um den Nachweis von geringen *Salmonellen*zahlen oder gestressten *Salmonellen* zu ermöglichen.

Gestresste Mikroorganismen werden hier als solche definiert, die in der Umgebung vorhanden sind, die verletzt sein können oder die sich in rauen Umgebungen entwickelt haben können. Solche Organismen können schwer zu erkennen sein, weil sie auf Selektivmedien nur schwer wachsen. Unter geeigneten Bedingungen können sie jedoch die zellulären Schäden reparieren und ihre normalen Merkmale wiedererlangen.

4.2 Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium

Gepuffertes Peptonwasser (BPW, en: buffered peptone water), das 10 mg/l Novobiocin enthält, wird bei Raumtemperatur mit der Prüfmenge beimpft und anschließend für (18 ± 2) h bei 34 °C bis 38 °C bebrütet.

Bei großen Mengen (z. B. 1 l oder mehr) wird das BPW auf 34 °C bis 38 °C vorgewärmt, bevor es mit der Prüfmenge vermischt wird.

4.3 Ausplattieren auf festen Selektivmedien

Aus der in 4.2 erhaltenen Anreicherung wird das chromogene Festmedium (5.2) beimpft.

Dieser Selektivagar wird bei 34 °C bis 38 °C für (24 ± 3) h bebrütet (oder nach Herstellerangaben, falls ausdrücklich empfohlen).

4.4 Bestätigung

Die präsumtiven *Salmonellen*-Kolonien werden durch eine geeignete serologische Untersuchung bestätigt. Ergibt die serologische Untersuchung ein negatives Ergebnis, ist die Beimpfung eines Selektivagars (B.5) erforderlich.

Falls die Untersuchung ein negatives Ergebnis liefert, werden bis zu 4 weitere vermutete Kolonien untersucht (wenn möglich und insgesamt bis zu 5 Kolonien).

5 Nährmedien, Reagenzien, Antiseren

5.1 Allgemeines

Zu aktueller Laborpraxis siehe EN ISO 7218:2007³ und EN ISO 11133:2014⁴.

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

5.2 Chromogener Isolierungsagar

Dieses Isolierungsmedium wird vom Untersuchungslabor ausgewählt und muss die enzymatische Aktivität der C8-Esterase hervorheben. Beispiele für Isolierungsmedien siehe Anhang C, Tabelle C.1.

5.3 Nicht-selektiver Agar

Mehrzweck-Agar, der das Wachstum eines breiten Spektrums von anspruchslosen Stämmen unterstützt. Siehe B.4.

5.4 Selektiver Bestätigungs-Agar

Dieses Isolierungsmedium wird vom Untersuchungslabor ausgewählt und muss die Bildung von Schwefelwasserstoff (H₂S) durch die Stämme hervorheben (siehe Abschnitt B.5). Beispiele für Isolierungsmedien siehe Anhang C, Tabelle C.2.

6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

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

Übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Labors (siehe EN ISO 7218:2007³) und insbesondere Folgendes:

6.1 Geräte für die Trockensterilisation (Heißluft-Sterilisator) oder Dampfsterilisation (Autoklav), wie in EN ISO 7218:2007³ angegeben.

6.2 Trocken- oder Wärmeschränk, in einem Bereich zwischen 25 °C und 50 °C einstellbar.

6.3 Brutschrank (Brutschränke), in einem Bereich von 34 °C bis 38 °C und auf (37 ± 1) °C einstellbar.

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

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

Es wird empfohlen, wegen der geringen Infektionsdosis von *Salmonella* spp. ein Wasserbad (6.4 und 6.5), das ein antibakterielles Mittel enthält, zu verwenden.

6.6 Kühleinheit, einstellbar auf (5 ± 3) °C.

6.7 Gefrierschränk, einstellbar auf (–20 ± 5) °C.

6.8 Sterile Impfösen mit einem Durchmesser von etwa 3 mm (10 µl Volumen).

6.9 pH-Messgerät mit einer Fehlergrenze der Kalibrierung von ±0,1 pH-Einheiten bei 20 °C bis 25 °C.

- 6.10 Sterile Röhrchen, Flaschen oder Kolben** mit Verschlüssen von geeignetem Fassungsvermögen.
- 6.11 Sterile Messpipetten oder automatische Pipetten** mit einem Nennvolumen von 25 ml, 10 ml, 1 ml und 0,1 ml.
- 6.12 Sterile Petrischalen** mit einem Durchmesser von etwa 90 mm und (optional) großer Größe (Durchmesser etwa 140 mm).
- 6.13 Peristaltischer Mischer** (Stomacher^{®5}) mit sterilen Beuteln.
- 6.14 Sterilfilter** mit Porenweiten von 0,2 µm.

7 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Teil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens (siehe EN 17702-1:—⁶ die sich auf das betreffende Produkt bezieht). Liegt keine spezifische Internationale oder Europäische Norm vor, wird den Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

Es ist wichtig, dass das Labor eine repräsentative Laborprobe (3.3) erhält, die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

8 Herstellung der Untersuchungsprobe

Die Herstellung der Untersuchungsprobe (3.4) aus der Laborprobe ist nicht Teil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens (siehe EN 17702-1:—⁶).

Für die mikrobiologische Untersuchung wird die für das betreffende Produkt geeignete Norm befolgt, wenn der Hersteller kein spezifisches Verfahren zur Verfügung stellt. Es wird, falls erforderlich, eines oder mehrere der Geräte verwendet, je nach Art des Produkts.

Alle Arbeitsgänge vor und nach dem Öffnen des Produkts müssen unter aseptischen Bedingungen durchgeführt werden, um eine Kontaminierung von außen zu verhindern.

Es müssen sterile Materialien und Geräte verwendet werden.

Gefrorene Produkte dürfen vor der Untersuchung aufgetaut werden, indem sie bei 18 °C bis 27 °C (Laborumgebungstemperatur) für höchstens 3 h oder bei (5 ± 3) °C für höchstens 24 h stehengelassen werden. Im Anschluss daran müssen die Proben so schnell wie möglich untersucht werden.

Feste (pulverförmige und granuliert) Produkte müssen in ihrem Behälter gründlich durchmischt und unter Anwendung aseptischer Techniken gewägt werden, wobei die erforderliche Prüfmenge stichprobenartig in kleinen Schritten mit einem Spatel entnommen wird.

Bei Trockenprodukten und anderen Produkten mit geringem Wassergehalt ist es wichtig, das Verdünnungsmittel einzuwägen und es dann schrittweise zur Prüfmenge hinzuzufügen, um den osmotischen Stress für jegliche vorhandene Mikroorganismen zu verringern.

Bei flüssigen Produkten sollte vor Entnahme der Prüfmenge die Laborprobe von Hand geschüttelt werden, um sicherzustellen, dass die Mikroorganismen gleichmäßig verteilt sind.

5 Stomacher[®] ist ein Beispiel für ein handelsübliches geeignetes Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produkts durch CEN.

6 In Vorbereitung.

9 Durchführung

9.1 Prüfmenge und Erstverdünnung

Für die Herstellung der Erstverdünnung wird das in Abschnitt B.2 festgelegte Anreicherungsmedium (gepuffertes Peptonwasser) als Verdünnungsmittel verwendet. Das mit Novobiocin ergänzte BPW (nBPW, siehe B.3) wird vor der Verwendung auf Raumtemperatur vorgewärmt.

Von der Prüfmenge (3.5) werden 25 g oder 25 ml gewägt und mit 225 ml nBPW versetzt, um eine zehnfache Verdünnung zu erhalten entsprechend den Anforderungen von EN 17708:—¹.

Bei festen Rezepturen: Kurz darauf wird die gesamte Suspension entnommen und in einem Stomacher (6.13) für 2 min bei höchster Drehzahl vermischt. Danach wird mit der Bebrütung fortgefahren.

Bei flüssigen Rezepturen: Kurz darauf wird die gesamte Suspension entnommen und mit der Bebrütung fortgefahren.

9.2 Selektive Anreicherung

Die Erstverdünnung (9.1) wird bei 34 °C bis 38 °C (6.3) für (18 ± 2) h bebrütet.

Es ist zulässig, die angereicherte Probe nach der Bebrütung bei 5 °C (6.6) für maximal 72 h zu lagern (siehe Literaturhinweise [2] [3] [4] [5]).

9.3 Isolierung

Aus der selektiven Anreicherung (9.2) wird mit einer 10-µl-Impföse (6.8) die Oberfläche des chromogenen Isolierungsgars (5.2) beimpft, sodass gut isolierte Kolonien erhalten werden.

Die Platten werden dann an die Raumtemperatur angepasst, wenn sie bei einer niedrigeren Temperatur gelagert wurden. Falls erforderlich, wird die Oberfläche der Platten vor der Verwendung getrocknet (siehe EN ISO 11133:2014⁴).

Das selektive Ausstreichmedium wird bei 34 °C bis 38 °C (6.3) für (24 ± 3) h bebrütet (oder nach den Anweisungen des Herstellers, falls ausdrücklich empfohlen).

Typische Kolonien, die die C8-Esterase-Aktivität aufweisen, sind glatt (oder selten rau), rund und magentafarben.

Nach der Bebrütung wird das chromogene Medium auf die Anwesenheit von Kolonien überprüft, die aufgrund ihrer Merkmale als verdächtige Kolonien angesehen werden.

9.4 Bestätigung

9.4.1 Allgemeines

Die Kombination aus enzymatischer Aktivität und serologischen Untersuchungsergebnissen zeigt an, ob ein Isolat zur Gattung *Salmonella* gehört oder nicht. Zur Charakterisierung von *Salmonellen*-Stämmen ist eine vollständige Serotypisierung erforderlich.

Für eine klare Unterscheidung zwischen positiven und negativen serologischen Reaktionen ist es hilfreich, die Reaktionen der Medien jeder biochemischen Untersuchung mit gut charakterisierten positiven und negativen Kontrollstämmen zu überprüfen.

9.4.2 Auswahl von Kolonien für die Bestätigung

Verdächtige Kolonien werden auf jeder Platte (9.3) markiert. Eine verdächtige Kolonie wird für die Bestätigung ausgewählt. Wenn diese negativ ist, werden bis zu vier weitere verdächtige Kolonien ausgewählt (Untersuchung von insgesamt bis zu 5 Kolonien).

Wenn gut isolierte Kolonien auf den selektiven Ausstreichmedien (9.3) vorhanden sind, kann die serologische und biologische Bestätigung direkt an einer verdächtigen Kolonie durchgeführt werden. Wenn nur eine verdächtige Kolonie vorhanden ist, wird eine Subkultur dieser Kolonie auf einem nicht-selektiven Agar (5.3) angelegt, um eine Reinkultur mit genügend Material zum Arbeiten zu erhalten.

9.4.3 Serologische Untersuchung

9.4.3.1 Allgemeines

Die verdächtigen Kolonien (9.4.2) werden auf Autoagglutination untersucht. Stämme, die autoagglutinierbar sind, können nicht auf das Vorhandensein von *Salmonellen*-Antigenen untersucht werden und müssen durch eine Untersuchung auf Bildung von H₂S (9.4.4) bestätigt werden. Die verdächtigen Kolonien werden durch Objektträgeragglutination mit polyvalenten Antiseren (Abschnitt B.7) auf das Vorhandensein von *Salmonellen*-O- und -H-Antigenen untersucht. Um das Vorhandensein von *Salmonellen*-O- und -H-Antigenen nachzuweisen, werden die Antiseren nach den Anweisungen des Herstellers verwendet, wenn diese von dem unten beschriebenen Verfahren abweichen.

Die folgenden Untersuchungen (9.4.3.2 bis 9.4.3.5) sind die Mindestanforderungen für die serologische Untersuchung von *Salmonella* spp.

9.4.3.2 Eliminierung von autoagglutinierbaren Stämmen

Ein Tropfen Kochsalzlösung (B.6) wird auf einen sauberen Glasobjektträger gegeben. Mit einer Impfähse wird ein Teil der zu untersuchenden Kolonie in der Kochsalzlösung dispergiert, um eine homogene und trübe Suspension zu erhalten.

Der Objektträger wird 5 s bis 60 s (je nach Herstellerangaben) vorsichtig hin und her bewegt. Die Suspension wird beobachtet, vorzugsweise vor einem dunklen Hintergrund. Wenn die Bakterien in der Suspension Granulat gebildet haben, deutet dies auf eine Autoagglutination hin und die serologische Bestätigung wird erschwert. Weitere Informationen zur Behandlung von autoagglutinierenden Stämmen sind in CEN ISO/TR 6579-3:2014 [6] enthalten.

9.4.3.3 Untersuchung auf O-Antigene

Unter Verwendung einer nicht autoagglutinierenden Reinkolonie wird nach 9.4.3.2 vorgegangen, wobei anstelle der Kochsalzlösung ein Tropfen polyvalenter Anti-O-Seren (B.7) verwendet wird.

Tritt eine Agglutination auf, wird dies als positive Reaktion gewertet.

9.4.3.4 Untersuchung auf H-Antigene

Unter Verwendung einer nicht autoagglutinierenden Reinkolonie wird nach 9.4.3.2 vorgegangen, wobei anstelle der Kochsalzlösung ein Tropfen polyvalenter Anti-H-Seren (B.7) verwendet wird.

Tritt eine Agglutination auf, wird dies als positive Reaktion gewertet.

9.4.3.5 Interpretation der serologischen Reaktionen

Tabelle 1 zeigt die Interpretation der Bestätigungsuntersuchungen (9.4), die an den verwendeten Kolonien (9.4.2) durchgeführt wurden.

Tabelle 1 — Interpretation der Bestätigungsuntersuchungen

C8-Esterase-Aktivität	Autoagglutination	Serologische Reaktionen	Interpretation
Typisch	nein	O- und/oder H-Antigene positiv	Nachweis
Typisch	nein	O- und H-Antigene negativ	Verdacht auf <i>Salmonellen</i> : Untersuchung auf H ₂ S-Bildung (9.4.4)
Typisch	ja	nicht untersucht wegen Autoagglutination (siehe 9.4.3.2)	Verdacht auf <i>Salmonellen</i> : Untersuchung auf H ₂ S-Bildung (9.4.4)
Keine typischen Reaktionen	—	—	kein Nachweis

9.4.4 Selektivmedium für die H₂S-Bildung

Da einige Serotypen von *Salmonellen* eine sehr schwache oder keine Agglutinationsreaktion (z. B. *Arizonae*, *Dia-rizonae*) zeigen, ist bei einer negativen serologischen Reaktion eine weitere Bestätigungsuntersuchung erforderlich.

Die verdächtigen Kolonien (9.4.2) werden auf die Oberfläche eines vorgetrockneten Selektivagars (5.4) so ausgestrichen, dass sich gut isolierte Kolonien entwickeln können. Die Platten werden bei 34 °C bis 38 °C für (24 ± 3) h (oder nach den Anweisungen des Herstellers, falls ausdrücklich empfohlen) bebrütet.

ANMERKUNG Die meisten *Salmonellen*-Serotypen, die eine negative serologische Reaktion zeigen, sind in der Lage, H₂S zu produzieren, und umgekehrt zeigen Stämme, die H₂S-negativ sind, eine Agglutinationsreaktion.

Das Vorhandensein von typischen Kolonien mit schwarzem Zentrum auf den selektiven Bestätigungsmedien bezeugt den Nachweis von *Salmonella* spp. in der Probe. Das Vorhandensein von Kolonien ohne Schwärzung muss als Nichtnachweis von *Salmonella* spp. interpretiert werden.

9.4.5 Serotypisierung

Bestätigte Stämme können bei Bedarf zur endgültigen Typisierung (Serotypisierung, Phagentypisierung, molekulare Typisierung) an ein anerkanntes *Salmonellen*-Referenzzentrum geschickt werden. Wenn der Stamm an ein Referenzzentrum geschickt wird, sollten alle relevanten Informationen beigefügt werden, wie z. B. die Bestätigungsergebnisse, die Quelle, aus der der Stamm isoliert wurde, und ob es sich um ein Isolat aus einem Ausbruch handelt.

10 Angabe der Ergebnisse

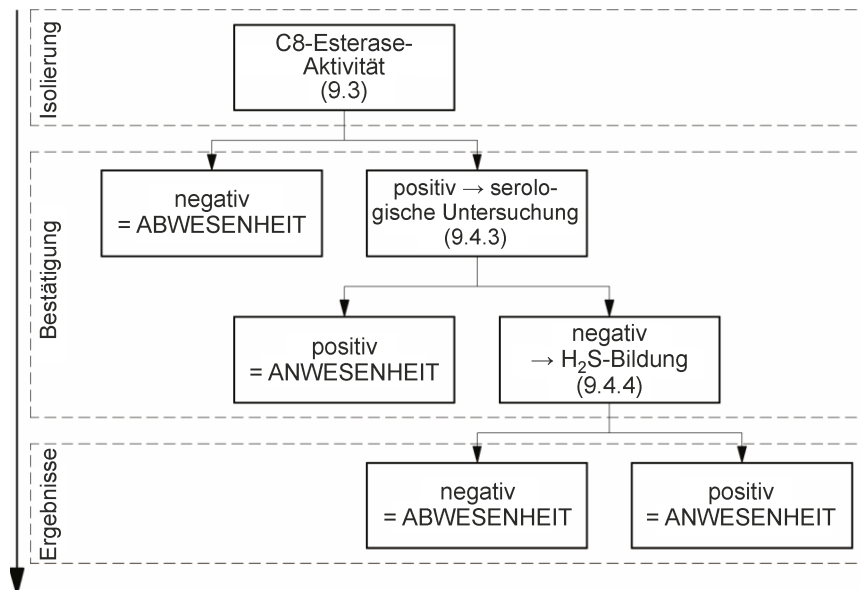


Bild 1 — Interpretation der biologischen und serologischen Ergebnisse

Entsprechend der Interpretation der Ergebnisse (siehe Bild 1) wird die Anwesenheit oder Abwesenheit bestätigter *Salmonellenspezies* in der Prüfmenge von 25 g oder 25 ml des Produkts angegeben.

11 Leistungsmerkmale des Verfahrens

11.1 Ringversuche

Die Leistungsmerkmale des Verfahrens wurden in einem Ringversuch ermittelt; dabei wurden Empfindlichkeit (11.2), Spezifität (11.3) sowie der positive und der negative Vorhersagewert (11.4, 11.5) des Verfahrens bestimmt. Die Werte sind in Anhang D zusammengefasst.

Diese Werte sind möglicherweise nicht auf andere als die in Anhang D angegebenen Matrixtypen anwendbar. Außerdem wurden die in Anhang D angegebenen Leistungsmerkmale mit einzelnen Prüfmengen von 25 g (oder ml) ermittelt. Bei Verwendung anderer Prüfmengen können sich abweichende Leistungsmerkmale ergeben.

11.2 Empfindlichkeit

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

11.3 Spezifität

Die Spezifität ist definiert als die Anzahl der als negativ ermittelten 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 folgende Informationen enthalten:

- falls bekannt, das angewendete Probenahmeverfahren;
- die Größe der Prüfmenge und/oder die Art des untersuchten Objekts;
- das angewendete Untersuchungsverfahren mit Verweisung auf dieses Dokument, d. h. EN 17717:—;
- alle Abweichungen im Hinblick auf die verwendeten Anreicherungsmedien oder die angewandten Bebrü-
tungsbedingungen;
- alle in diesem Dokument nicht festgelegten oder als optional angesehenen Arbeitsbedingungen,
einschließlich Einzelheiten über alle Vorkommnisse, die die Ergebnisse beeinflusst haben könnten;
- die erhaltenen Ergebnisse.