DIN EN ISO 13136-1

ICS 07.100.30

Entwurf

Einsprüche bis 2024-04-16
Vorgesehen als
teilweiser Ersatz für
DIN CEN ISO/TS 13136
(DIN SPEC 10794):2013-04

Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Nachweis, Isolierung und Charakterisierung von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) – Teil 1: Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Isolierung von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) (ISO/DIS 13136-1:2024); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 13136-1:2024

Microbiology of the food chain –
Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) –
Part 1: Horizontal method for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) (ISO/DIS 13136-1:2024);
German and English version prEN ISO 13136-1:2024

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Détection et isolement des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) –
Partie 1: Méthode horizontale pour la détection et l'isolement des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) (ISO/DIS 13136-1:2024);
Version allemande et anglaise prEN ISO 13136-1:2024

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-02-16 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument 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.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 70 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 13136-1:2024) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigefügt. 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 6887 (alle Teile)	siehe	DIN EN ISO 6887 (alle Teile)
ISO 7218	siehe	DIN EN ISO 7218
ISO 7550	siehe	DIN ISO 7550
ISO 16140-2	siehe	DIN EN ISO 16140-2
ISO 16140-4	siehe	DIN EN ISO 16140-4
ISO 17468	siehe	DIN EN ISO 17468
ISO 22118	siehe	DIN EN ISO 22118
ISO 22119	siehe	DIN EN ISO ´22119
ISO 22174	siehe	DIN EN ISO 22174

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 ISO/TS 13136 (DIN SPEC 10794):2013-04 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

a) Veröffentlichungsform von Technischer Spezifikation zu vollständiger Norm geändert und in 2 Teile aufgeteilt;

b) Änderung der Anreicherungsbedingungen, einschließlich Medium und Temperatur;

c) Streichung der Bestimmung des Vorhandenseins des Gens eae und der Gene, die mit den Serogruppen O157, O111, O26, O103 und O145 assoziiert sind aus dem Screening der Anreicherungskulturen und in den STEC-Isolaten (inkludiert als Charakterisierung der STEC-Isolate in Teil 2);

d) redaktionelle Überarbeitung des Dokuments.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 6887 (alle Teile), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen*

DIN EN ISO 7218, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen*

DIN EN ISO 16140-2, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens*

DIN EN ISO 16140-4, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 4: Arbeitsvorschrift für Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung*

DIN EN ISO 17468, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Technische Anforderungen und Leitfaden zur Einführung oder Überarbeitung eines genormten Referenzverfahrens*

DIN EN ISO 22118, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Leistungsmerkmale*

DIN EN ISO 22119, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe*

DIN EN ISO 22174, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Mikroorganismen — Allgemeine Anforderungen und Definitionen*

DIN ISO 7550, *Laborgeräte aus Glas — Einmal-Kapillarpipetten auf Einguss*

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

– Leerseite –

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

– Entwurf –

Februar 2024

prEN ISO 13136-1

Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Nachweis, Isolierung und Charakterisierung von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) – Teil 1: Horizontales Verfahren zum Nachweis und zur Isolierung von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) (ISO/DIS 13136-1:2024)

Microbiology of the food chain – Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) – Part 1: Horizontal method for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) (ISO/DIS 13136-1:2024)

Microbiologie de la chaîne alimentaire – Détection et isolement des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) – Partie 1: Méthode horizontale pour la détection et l'isolement des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) (ISO/DIS 13136-1:2024)

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

E DIN EN ISO 13136-1:2024-03
prEN ISO 13136-1:2024 (D)

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort . . . 4
Vorwort . . . 5
Einleitung . . . 6
1 Anwendungsbereich . . . 7
2 Normative Verweisungen . . . 7
3 Begriffe . . . 7
4 Kurzbeschreibung . . . 8
4.1 Allgemeines . . . 8
4.2 Mikrobielle Anreicherung . . . 8
4.3 Nukleinsäureextraktion . . . 8
4.4 Ziel-Gene . . . 8
4.5 Nachweis und Isolierung . . . 9
5 Kulturmedien und Reagenzien . . . 9
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien . . . 9
7 Probenahme . . . 10
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe . . . 11
9 Durchführung . . . 11
9.1 Einwaage und Erstverdünnung . . . 11
9.2 Anreicherung . . . 11
9.3 Nukleinsäureextraktion . . . 12
9.4 Amplifikation mittels PCR (Real-time-PCR) . . . 12
9.4.1 Allgemeines . . . 12
9.4.2 Auswertung von PCR-Ergebnissen . . . 12
9.4.3 Interne Amplifikationskontrolle bei der Real-time-PCR . . . 13
9.5 Isolierung der STEC-Stämme . . . 13
10 Auswertung . . . 15
11 Validierung des Verfahrens . . . 16
12 Untersuchungsbericht . . . 16
13 Qualitätssicherung . . . 17
Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens . . . 18
Anhang B (normativ) Kulturmedien und Reagenzien . . . 19
B.1 Allgemeines . . . 19
B.2 Gepuffertes Peptonwasser (BPW) . . . 19
B.2.1 Zusammensetzung . . . 19
B.2.2 Herstellung . . . 19
B.3 Trypton-Galle-X-Glucuronid-Agar (TBX) . . . 20
B.3.1 Zusammensetzung . . . 20
B.3.2 Herstellung . . . 20
B.3.3 Herstellung der TBX-Agarplatten . . . 20
B.4 Nähragar (Beispiel für ein nicht selektives Medium) . . . 20
B.4.1 Zusammensetzung . . . 20
B.4.2 Herstellung . . . 21
B.4.3 Herstellung der Nähragarplatten . . . 21
B.5 Trypticase-Soja-Bouillon-Hefeextrakt (TSBYE) (optional, siehe Verfahren in Anhang F) . . . 21
B.5.1 Zusammensetzung . . . 21
B.5.2 Herstellung . . . 21
B.6 Leistungsprüfung . . . 22
Anhang C (normativ) Fließschema für die Isolierung von STEC-Stämmen . . . 23
Anhang D (normativ) Primer und Sonden für die Real-time-PCR-Assays . . . 24
D.1 Allgemeines . . . 24
D.2 Primer und Sonden . . . 24

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

Anhang E (informativ) **Identifizierung von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) durch Amplifikation von Virulenzgenen mittels Multiplex-PCR und Nachweis von PCR-Produkten mit Agarose-Gelelektrophorese** 25
E.1 Allgemeines 25
E.2 Abkürzungen 25
E.3 Durchführung 25
E.3.1 Kurzbeschreibung des Verfahrens 25
E.3.2 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien 25
E.3.3 Reagenzien und Medien 26
E.3.4 Sicherheits- und Schutzvorrichtungen 27
E.3.5 Referenzstämme und Prozesskontrolle 27
E.3.6 Vorbereitung des PCR-Templates 27
E.3.7 Durchführung der PCR-Reaktion 27
E.3.8 Agarosegel-Elektrophorese 28
E.3.9 Auswertung 28
Anhang F (informativ) **Säurebehandlung der Anreicherungskulturen** 30
Anhang G (informativ) **Nachweis von *Escherichia coli*, die den Stx2f-Subtyp bilden, mittels Real-time-PCR (Auszug aus dem Verfahren EURL-VTEC_Method_10 [5])** 31
G.1 Allgemeines 31
G.2 Real-time-PCR für den Nachweis von *stx2f* 31
G.3 Isolierung von Stx2f-bildenden *E.-coli*-Stämmen 32
Literaturhinweise 33

Bilder

Bild A.1 — Diagramm des Verfahrens zum Nachweis von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) 18
Bild C.1 — Ablaufschema des Verfahrens zur Isolierung von STEC-Stämmen 23
Bild G.1 — Fließschema des Verfahrens 32

Tabellen

Tabelle 1 — Empfindlichkeit der Real-time-PCR-Assays für *stx1*/*stx2* nach Bebrütung von Anreicherungskulturen bei zwei Temperaturen (Screening-Schritt) 16
Tabelle 2 — Für den Isolierungsschritt berechnete Empfindlichkeit 16
Tabelle B.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien und Reagenzien 22
Tabelle D.1 — Degenerierte Primer und Sonden, die für 5'-Nuklease-PCR-Assays verwendet werden 24
Tabelle E.1 — Amplifikationsfragmente der zu erwartenden Größe 28
Tabelle G.1 — Primer und TaqMan®[a]-Sonde, die für die vom EURL für *E. coli* entwickelte 5'-Nuklease-PCR-Assays verwendet werden 31
Tabelle G.2 — Primer für den Nachweis des *stx2f*-Subtyps in gepoolten oder einzelnen Kolonien 32

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 13136-1:2024) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird CEN ISO/TS 13136:2012 ersetzen.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 13136-1:2024 wurde von CEN als prEN ISO 13136-1:2024 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC Directives, Teil 1, beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC Directives, Teil 2, erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 463, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Diese erste Ausgabe von ISO 13136-1 ersetzt zusammen mit ISO 13136-2 die erste Ausgabe der Technischen Spezifikation (ISO/TS 13136:2012), die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

— Struktur der Norm (Vollständige Norm statt einer Technischen Spezifikation, aufgeteilt in Teil 1 und Teil 2)

— Änderung bei den Anreicherungsbedingungen (einschließlich Medium und Temperatur)

— Entfernung der Bestimmung des Vorhandenseins des Gens *eae* und der mit den Serogruppen O157, O111, O26, O103 und O145 assoziierten Gene aus dem Screening der Anreicherungskulturen und in den STEC-Isolaten (in Teil 2 als Charakterisierung der STEC-Isolate aufgenommen)

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 13136 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

Einleitung

Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli* (STEC) sind lebensmittelbedingte Pathogene, die beim Menschen Erkrankungen hervorrufen können, welche von unkomplizierter Diarrhoe (Durchfall) bis zu schweren Erkrankungen wie z. B. enterohämorrhagischer Colitis und hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) reichen können. STEC werden anhand der Bildung von Shiga-Toxin (Stx), gleichbedeutend mit Verocytotoxin (VT), von anderen *E. coli* unterschieden. Die Stx-Familie wird auf Antigenbasis in zwei Haupttypen unterteilt: Stx1 und Stx2. STEC-Stämme können für Stx1 und/oder Stx2 kodierende Gene besitzen. Die Serotypen von STEC, die beim Menschen eine Erkrankung verursachen können, sind stark unterschiedlich und entwickeln sich kontinuierlich weiter; alle STEC-Isolate werden deshalb als potentiell humanpathogene Keime angesehen. [1] Daher repräsentieren STEC-Stämme unabhängig von der Serogruppe den Zielorganismus dieser Internationalen Norm. In diesem Normverfahren wurde die folgende Nomenklatur angewendet:

stx: Shiga-Toxin-Gene (gleichbedeutend mit *vtx*);

Stx: Shiga-Toxin (gleichbedeutend mit VT);

STEC: Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli* (gleichbedeutend mit VTEC: Verocytotoxin bildende *Escherichia coli*).

Die im Vorwort aufgezählten wesentlichen technischen Änderungen gegenüber ISO/TS 13136:2012, die in diesem Dokument eingeführt werden, gelten als erheblich (siehe ISO 17468 [2]).

Diese technischen Änderungen haben einen erheblichen Einfluss auf die Leistungsmerkmale des Verfahrens.

Bei zukünftigen Überarbeitungen dieses Dokuments werden dabei sämtliche jeweils verfügbaren Informationen über den Umfang, in dem dieses horizontale Verfahren befolgt wurde, und die Gründe für Abweichungen von diesem Verfahren bei bestimmten Produkten berücksichtigt.

Identifizierung der Inhaber von Patentrechten: Der folgende Text muss aufgenommen werden, wenn Patentrechte festgestellt worden sind. [Der Prozess ist derzeit noch nicht abgeschlossen.]

Die Internationale Organisation für Normung (ISO) weist darauf hin, dass die Übereinstimmung mit diesem Dokument die Verwendung eines Patents bedeuten kann.

ISO nimmt keine Stellung bezüglich des Nachweises, der Gültigkeit und des Anwendungsbereichs dieses Patentrechts.

Der Inhaber dieses Patentrechts hat ISO gegenüber eine Bereitschaft versichert, mit Anwendern weltweit über Lizenzen zu annehmbaren und nicht benachteiligenden Bedingungen zu verhandeln. Diesbezüglich ist die Erklärung des Inhabers dieses Patentrechts bei ISO registriert. Informationen können der Patentdatenbank entnommen werden, die unter www.iso.org/patents verfügbar ist.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können, ohne dass diese in der Datenbank aufgeführt sind. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

1 Anwendungsbereich

Diese Norm beschreibt den Nachweis und die Isolierung von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC). Das Verfahren umfasst den Nachweis mittels Real-time-PCR von *stx1* und *stx2*, den wichtigsten Virulenzgenen von STEC (Literaturhinweis [1]), in Anreicherungskulturen. Die Isolierung von STEC aus der Anreicherungskultur wird versucht, wenn eines oder beide der *stx*-Gene nachgewiesen werden.

Dieses Dokument ist anwendbar auf

— Erzeugnisse, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind,

— Erzeugnisse, die als Futtermittel vorgesehen sind,

— Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und Handhabung von Lebensmitteln und Futtermitteln, und

— Proben aus dem Bereich der Primärproduktion.

WARNUNG Zum Schutz der Gesundheit des Laborpersonals ist es unerlässlich, dass Prüfungen zum Nachweis von STEC nur in Laboratorien mit geeigneter Ausstattung und unter der Leitung eines qualifizierten Mikrobiologen erfolgen und dass bei der Entsorgung allen inkubierten Materials mit äußerster Vorsicht vorgegangen wird. Personen, die dieses Dokument anwenden, sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, sämtliche Sicherheitsaspekte, die sich aus seiner Anwendung ergeben, zu berücksichtigen. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, in Übereinstimmung mit nationalen und internationalen Vorschriften geeignete Sicherheits- und Gesundheitsvorschriften in Bezug auf den Umgang mit und die Einkapselung von biologischen Arbeitsstoffen zu erarbeiten.

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. Es gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 6887 (alle Teile), *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension, and decimal dilutions for microbiological examination*

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

ISO 22118, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens — Performance characteristics*

ISO 22174, *Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions*

ISO 22119, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

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

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

3.1
Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli* (STEC)
E. coli-Stämme, die über ein oder mehrere Shiga-Toxin (Stx) kodierende Gene (*stx*) verfügen

3.2
Stx1 und Stx2
Shiga-Toxin-Typ 1 bzw. Shiga-Toxin-Typ 2

3.3
stx1* und *stx2
Gene, die Stx1 bzw. Stx2 kodieren

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Das festgelegte Verfahren umfasst die folgenden aufeinanderfolgenden Schritte; siehe das Fließschema in Anhang A:

a) mikrobielle Anreicherung;

b) Nukleinsäureextraktion;

c) Nachweis von *stx*-Virulenzgenen (in Anhang D beschrieben — dies kann auch als Multiplex-PCR, zusammen mit einer internen Amplifikationskontrolle, erfolgen, siehe 9.4.3);

d) Isolierung von STEC-Stämmen aus *stx*-positiver Anreicherungskultur durch Feststellen des Vorhandenseins von Stx-kodierenden Genen in isolierten Kolonien, um das Vorhandensein von STEC zu bestätigen — (siehe 9.5 und Anhang C).

4.2 Mikrobielle Anreicherung

Die Anzahl der lebensfähigen STEC-Keime, die für den Nachweis in der Einwaage verfügbar sind, wird durch statische Bebrütung der Probe in gepuffertem Peptonwasser (BPW, en: buffered peptone water) (einem nicht selektiven flüssigen Nährmedium) bei 41,5 °C für (21 ± 3) h erhöht.

Wenn vermutlich verletzte Zellen in der Probe vorhanden sind (z. B. gefrorene, mit UV oder Druck behandelte Lebensmittel, Mehle, getrocknete Lebensmittel), wird die BPW-Kultur für (6 ± 1) h bei 37 °C und danach für weitere (18 ± 3) h bei 41,5 °C bebrütet, um die Zahl lebensfähiger STEC-Keime zu erhöhen.

4.3 Nukleinsäureextraktion

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA, en: deoxyribonucleic acid) wird für die Analyse durch einen Real-time-PCR-Assay zum Nachweis der Shiga-Toxine kodierenden Gene aus Anreicherungskulturen extrahiert.

4.4 Ziel-Gene

Die primären Virulenzgene von STEC sind die *stx*-Gene, welche die Shiga-Toxine kodieren. Die *stx*-Gene kodieren eine Familie von Toxinen, die zwei Haupttypen umfasst: Stx1 und Stx2. Bei den *stx*-Sequenzen wurde eine große Variabilität beschrieben; sie können in drei Subtypen von *stx1* (*stx1a*, *stx1c* und *stx1d*) und mindestens sieben Subtypen von *stx2* (*stx2a* bis *stx2g*) unterteilt werden (Literaturhinweis [3]). Mit den in dieser Norm beschriebenen PCR-Primern und -Sonden werden alle zuvor genannten *stx*-Subtypen, mit Ausnahme von *stx2f* nachgewiesen. Die für Stx2f kodierende Gensequenz weicht deutlich von den anderen Subtypen

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

ab und ist keine Zielsequenz für die in dieser Norm angegebenen *stx*-Primer und -Sonden. Nach den gegenwärtig verfügbaren Daten wurde der Nachweis von *stx2f* in Lebensmitteln selten dokumentiert (Literaturhinweise [4] und [5]); nichtsdestotrotz ist diese Variante vor kurzem mit einer Erkrankung des Menschen in Verbindung gebracht worden (Literaturhinweis [6]). Falls eine spezifische Notwendigkeit für den Nachweis von Stx2f-bildenden *E. coli* in Lebensmitteln besteht, beispielsweise bei Prävalenzstudien, epidemiologischen Untersuchungen oder aufgrund behördlicher Anordnung, kann ein vom Referenzlaboratorium der Europäischen Union (EURL) herausgegebenes Protokoll für *E. coli* zum Nachweis von *stx2f* durch Real-time-PCR verwendet werden. Dieses Verfahren, EU-RL VTEC_Method_10, Literaturhinweis [7], ist unter dem folgenden Link abrufbar: https://www.iss.it/documents/20126/0/EURL-VTEC_Method_10_Rev+0.pdf/a4eb6e2b-fd13-c52a-112a-255c005b4872?t=1644309297880; es ist zudem als informativer Anhang in diese Norm aufgenommen worden (Anhang G). Das EURL-Protokoll für *E. coli* wird angewendet, um das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von *stx2f* in Anreicherungskulturen festzustellen, die in Bezug auf das Vorhandensein von *stx*-Genen in dem in der vorliegenden Norm beschriebenen Screening-Schritt zu einem negativen Ergebnis geführt haben.

Darüber hinaus werden fortlaufend neue Stx-Subtypen identifiziert, unter anderem Stx1e, Stx2h, Stx2i, Stx2j, Stx2k, Stx2l, Stx2m und Stx2o (Literaturhinweise [8] bis [13]). Ein *Ad-hoc*-Inklusivitätstest hat ergeben, dass diese in dieser Norm beschriebenen Primer-Sets, einschließlich der in Anhang G, den effektiven Nachweis aller *stx*-Subtypen, mit Ausnahme von *stx1e*, *stx2h*, *stx2j*, *stx2n* und *stx2o*, ermöglichen (mit freundlicher Genehmigung von Alexander Gill und Sarah Clark, Health Canada, 2023).

Der Nachweis der Ziel-Gene, *stx1* und *stx2*, wird entweder als Screening-Schritt anhand der aus der Anreicherungskultur extrahierten DNA oder anhand der DNA aus isolierten Kolonien beim Versuch, STEC unter den aus *stx*-positiven Anreicherungskulturen wiedergewonnenen Kolonien zu identifizieren, durchgeführt.

4.5 Nachweis und Isolierung

Die Real-time-PCR wird angewendet, um das *stx1*- und das *stx2*-Gen in der Anreicherungskultur nachzuweisen, und sie wird entsprechend der verwendeten PCR-Plattform und nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers des verwendeten Real-time-PCR-Kits durchgeführt.

Die Isolierung der STEC-Stämme aus der Anreicherungskultur ist erforderlich, um zu bestätigen, dass die positiven PCR-Signale von Genen erzeugt werden, die in lebenden Bakterienzellen vorhanden sind.

Falls *stx*-Gene in der Anreicherungskultur nachgewiesen werden, muss als zwingend erforderlicher Schritt versucht werden, STEC zu isolieren. Der Versuch der STEC-Isolierung muss durch Ausplattierung der Anreicherungskultur auf festen Medien erfolgen, und isolierte Kolonien werden auf das Vorliegen von *stx1* und *stx2* untersucht, entweder durch die in dieser Norm beschriebene Real-time-PCR (9.4) oder durch konventionelle PCR (Anhang E).

5 Kulturmedien und Reagenzien

Es werden aktuelle Laborpraktiken nach ISO 7218 befolgt. Die Zusammensetzung der Nährmedien und Reagenzien und ihre Herstellung sind in Anhang B festgelegt. In Bezug auf die Leistungsprüfung der Nährmedien siehe Tabelle B.1; außerdem sind die Verfahren nach ISO 11133 zu befolgen.

6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

Ausrüstungsgegenstände aus Kunststoff zum einmaligen Gebrauch mit geeigneten Kennwerten sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten. Übliche mikrobiologische Laborausrüstung (siehe ISO 7218) und die folgenden Geräte:

6.1 **Wasserbad oder Heizblock**, das/der bei Temperaturen bis zu 100 °C gehalten werden kann.

6.2 **Brutschrank**, geeignet für den Betrieb bei (41,5 ± 1) °C und bei (37 ± 1) °C.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

6.3 Für die Nukleinsäureextraktion notwendige Geräte. Geeignete Ausrüstung, z. B. Heizplatte, in Übereinstimmung mit dem angewendeten Verfahren (wenn notwendig).

6.4 Sterile Pipetten für unterschiedliche Volumina (zwischen 1 µl und 1 000 µl, siehe ISO 7550, Literaturhinweis [14]).

6.5 Dünnwandige Mikroröhrchen für Real-time-PCR oder andere Real-time-PCR-Kunststoffbehältnisse oder -Verbrauchsmaterialien: PCR-Mikrotiterplatten oder andere Kunststoffbehältnisse oder Kapillaren zum einmaligen Gebrauch.

6.6 Real-time-PCR-Gerät. Thermocycler mit einem Detektionsinstrument für Fluoreszenzemission nach dem 5'-Nuklease-PCR-Assay. Es sind Geräte unterschiedlicher Hersteller verfügbar, die in Übereinstimmung mit den Grundsätzen des Laboratoriums verwendet werden können.

6.7 Thermocycler (falls notwendig) und PCR-Mikroröhrchen. Es sind Geräte unterschiedlicher Hersteller verfügbar, die in Übereinstimmung mit den Grundsätzen des Laboratoriums verwendet werden können.

6.8 Beutel-Walkmischer mit sterilen Beuteln, möglicherweise mit einer Vorrichtung zum Einstellen von Geschwindigkeit und Zeit.

6.9 Mikrozentrifuge oder **Plattenzentrifuge**, falls eine 96-Well-Platte verwendet wird.

6.10 Heißluft-Sterilisator für die Trockensterilisation oder Autoklav für die Dampfsterilisation, anzuwenden entsprechend ISO 7218.

6.11 Trocken- oder belüfteter Wärmeschrank, in einem Bereich zwischen 25 °C und 50 °C einstellbar, oder eine Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom zum Trocknen der Platten (falls notwendig).

6.12 Kühlschrank zur Lagerung hergestellter Medien, auf (5 ± 3) °C einstellbar.

6.13 pH-Messgerät, bei 25 °C auf 0,01 pH-Einheiten ablesbar, ermöglicht **Messungen mit einer Genauigkeit von ±0,1 pH-Einheiten**.

6.14 Sterile Röhrchen, Flaschen oder **Kolben** mit Verschlüssen von geeignetem Fassungsvermögen.

Es dürfen Flaschen oder Kolben mit ungiftigen Schraubverschlüssen aus Metall oder Kunststoff verwendet werden.

6.15 Sterile Petrischalen, mit einem Durchmesser von etwa 90 mm und (optional) großer Größe (Durchmesser etwa 140 mm).

6.16 Sterile Zell-Ausstreichgeräte.

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

6.18 Laminarbox.

6.19 Sterilfilterspitzen.

6.20 PCR-Werkbank.

7 Probenahme

Die Probenahme ist kein Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens. Die das betreffende Produkt behandelnde spezifische Internationale Norm wird befolgt. Liegt keine spezifische Internationale Norm vor, die sich mit der Probenahme des betreffenden Produkts befasst, wird den Beteiligten empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

Empfohlene Probenahmeverfahren sind in den folgenden Dokumenten angegeben:

— ISO/TS 17728 für Lebensmittel und Futtermittel;

— ISO 707 für Milch und Milcherzeugnisse;

— ISO 13307 für Primärproduktion;

— ISO 17604 für Schlachttierkörper;

— ISO 18593 für Oberflächen.

Es ist wichtig, dass das Labor eine Probe erhält, die bei Ende der Probenahme für das untersuchte Produkt repräsentativ ist. Die Probe sollte während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert worden sein.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird nach der das betreffende Produkt behandelnden spezifischen Internationalen Norm vorbereitet. Dabei werden die in der Normenreihe ISO 6887 festgelegten Verfahren befolgt. Liegt keine derartige spezifische Internationale Norm vor, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen. Die Vorbehandlung von verbrauchtem Bewässerungswasser aus der Sprossproduktion darf durch Zentrifugation, wie im Dokument EU-RL VTEC_Method_09 (Literaturhinweis [15]) beschrieben, erfolgen.

9 Durchführung

9.1 Einwaage und Erstverdünnung

Das in dem einschlägigen Dokument von ISO 6887 (alle Teile) und gegebenenfalls einer zutreffenden spezifischen Internationalen Norm, die das betreffende Produkt behandelt, festgelegte Verfahren wird befolgt.

Die BPW-Boullion wird vor der Verwendung auf Raumtemperatur, oder bevorzugt auf die Bebrütungstemperatur (siehe 9.2.1), vorgewärmt.

Gefrorene Produkte sind bei Raumtemperatur aufzutauen und anschließend ist die Einwaage (x g oder x ml) mit 9x ml Anreicherungsbouillon, BPW, zu mischen.

Bei festem Probenmaterial wird die Einwaage (x g) unter aseptischen Bedingungen in einen sterilen Probenbeutel für einen Beutel-Walkmischer überführt. Es werden 9x ml der Anreicherungsbouillon, BPW (Anhang B), in das Behältnis mit der Einwaage hinzugefügt, um eine zehnfache Verdünnung zu erhalten. Die Verwendung von Beuteln mit Filter wird bevorzugt. Es wird im Beutel-Walkmischer (6.8) homogenisiert (siehe ISO 7218).

Bei flüssigem Probenmaterial wird die Einwaage (x ml) der flüssigen Probe unter aseptischen Bedingungen mit einer sterilen Pipette in ein geeignetes Behältnis (z. B. Röhrchen oder Flasche), das 9x ml der Anreicherungsbouillon BPW enthält, überführt.

ANMERKUNG Stuhlproben aus dem Bereich der Primärproduktion können entweder als Abstrichtupferproben (unter aseptischen Bedingungen in 10 ml Anreicherungsbouillon überführt) oder durch Hinzugeben unter aseptischen Bedingungen von 9x ml der Anreicherungsbouillon zur Einwaage der Probe (bis zu 25 g) untersucht werden. Siehe Literaturhinweis [16] für weitere Leitlinien.

9.2 Anreicherung

Die Untersuchungsprobe wird zur Anreicherung für (21 ± 3) h bei (41,5 ± 1) °C bebrütet. Wenn vermutlich gestresste Zellen in der Probe vorhanden sind (z. B. gefrorene, getrocknete, mit UV oder Druck behandelte Lebensmittel), wird für (6 ± 1) h bei (37 ± 1) °C und danach für weitere (18 ± 3) h bei (41,5 ± 1) °C bebrütet.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

Nach der Bebrütung werden die Anreicherungskulturen bei (4 ± 1) °C aufbewahrt, bis die Real-time-PCR abgeschlossen ist. Die Isolierung von STEC aus *stx*-positiven Anreicherungskulturen muss so bald wie möglich, spätestens jedoch innerhalb von 72 h, versucht werden. Die angereicherte Probe darf für eine längere Dauer gelagert werden, wenn sich bei der Verifizierung/Validierung des Probentyps keine negativen Auswirkungen auf die Wahrscheinlichkeit der STEC-Isolierung ergeben.

9.3 Nukleinsäureextraktion

Die Nukleinsäureextraktion muss nach ISO 20837 durchgeführt werden. Es ist ein geeignetes Nukleinsäure-Extraktionsverfahren für die bakterielle DNA-Reinigung aus 1 ml der Anreicherungskultur anzuwenden. Eine umfassende Liste an Verfahren ist in Literaturhinweis [19] zu finden. Alternativ dürfen kommerzielle Kits nach den Anweisungen der Hersteller verwendet werden.

9.4 Amplifikation mittels PCR (Real-time-PCR)

Das PCR-Screening auf das Vorliegen von *stx* soll die Proben identifizieren, die STEC enthalten könnten und daher der Isolierung unterzogen werden müssen. Die Isolierung lebensfähiger Zellen ist wichtig, um das Vorhandensein potentiell infektiöser STEC-Zellen zu bestätigen, da bei der PCR ein positives Signal durch die *stx*-Sequenzen oder durch teilweise homologe Sequenzen aus anderen Quellen (z. B. freie *stx*-Phagen oder tote und verletzte Zellen), die keine Gefahr darstellen, erzeugt werden könnte.

9.4.1 Allgemeines

Das beschriebene PCR-Amplifikationsprotokoll beruht auf der Real-time-PCR.

Alle in ISO 22174 festgelegten Anforderungen an die Amplifikation mittels PCR sind einzuhalten.

Primer und Nachweissonden für die Durchführung der Real-time-PCR zum Nachweis von *stx1* und *stx2* sind in Anhang D angeführt.

9.4.2 Auswertung von PCR-Ergebnissen

Die erhaltenen PCR-Ergebnisse, einschließlich der in ISO 22174 und nachfolgend festgelegten Kontrollen, werden von der mit dem Real-time-PCR-Gerät bereitgestellten Software ausgewertet. Während der Amplifikation überwacht die Software die Amplifikation mittels 5'-Nuklease-PCR durch Detektion der vom Reporterfarbstoff emittierten Fluoreszenz in jeder Probe, R_n. ΔR_n (Veränderung der detektierten Farbstoffemission) ist R_n minus die in den ersten Zyklen ermittelte Grundlinienintensität des Reporterfarbstoffs – dem Punkt, bei dem die Reaktion eine Fluoreszenzintensität über dem Hintergrundrauschen erreicht. Am Ende der PCR-Zyklen wird eine Reaktion als positiv angesehen, wenn ihre ΔR_n-Kurve den Schwellenwert überschreitet, der als das 10-Fache der Standardabweichung der mittleren Grundlinienemission festgelegt ist. Der Zyklusschwellenwert, C_t, wird definiert als die Nummer des Zyklus, bei dem die ΔR_n-Fluoreszenz einer Probe den festgelegten Schwellenwert überschreitet.

Als allgemeine Laborpraxis, insbesondere wenn die Ergebnisse nicht eindeutig sind, sollte das Laborpersonal die Amplifikationskurven überprüfen, um die Ergebnisse zu beurteilen. Positive Proben ergeben eine Kurve mit einem eindeutigen Anstieg der Fluoreszenz, beginnend von der Anzahl der Zyklen, die C_t entspricht.

Bei jedem PCR-Assay müssen positive und negative Kontrollen mituntersucht werden. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um DNA, die aus einem sowohl *stx1* als auch *stx2* enthaltenden STEC-Stamm (z. B. *E. coli* O157 EDL933, Referenzstamm WDCM 00188) extrahiert wurde. Die Negativkontrolle wird wie in ISO 22174 beschrieben hinzugefügt. Weitere Informationen zu diesen Kontrollen können E.3.8 entnommen werden.

Wenn die Kontrollen zu unerwarteten Ergebnissen führen, ist das Verfahren zu wiederholen.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

9.4.3 Interne Amplifikationskontrolle bei der Real-time-PCR

Bei der Durchführung der Real-time-PCR wird in jedem Reaktionsansatz eine interne Amplifikationskontrolle (IAC, en: internal amplification control) eingesetzt, um auf Abwesenheit von PCR-Inhibitoren, die die korrekte Amplifikation der Zielsequenz behindern, zu prüfen. Falls eine Inhibition der PCR, d. h. eine fehlende Amplifikation bei der IAC, festgestellt wird, dürfen die entsprechend 9.3 hergestellten DNA-Extrakte in sterilem DNase-freien und RNase-freien Wasser oder Puffer verdünnt werden. Die notwendige Verdünnungsstufe ist unterschiedlich und hängt von der Matrix ab; empfohlen wird ein Bereich von 1 : 10 bis 1 : 100. Alternativ zur Verdünnung dürfen handelsübliche Kits zur Entfernung von PCR-Inhibitoren entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers verwendet werden.

Für die Real-time-PCR sind verschiedene interne Amplifikationskontrollen (IACs) verfügbar, zum Beispiel:

— Im Handel erhältliche IACs, einschließlich derjenigen, die in einigen Mastermix-Kits für die Real-time-PCR enthalten sind. Sie müssen nach den Anweisungen des jeweiligen Herstellers verwendet werden.

— pUC19. Für die auf der veröffentlichten Sequenz von pUC19 beruhende interne Amplifikationskontrolle IAC siehe Literaturhinweis [20]. Je PCR-Reaktionsansatz sollten etwa 50 Kopien der Ziel-DNA (pUC19) verwendet werden. Die Größe der IAC beträgt 119 bp.

9.5 Isolierung der STEC-Stämme

Die Isolierung der STEC-Stämme ist erforderlich, um zu bestätigen, dass die positiven PCR-Signale von Genen erzeugt werden, die in einer lebenden Bakterienzelle vorhanden sind.

Die Anreicherungskulturen werden gekühlt (bei (4 ± 1) °C) aufbewahrt, bis die Real-time-PCR-Ergebnisse vorliegen. Die Isolierung aus den positiven Proben sollte so bald wie möglich versucht werden, da die Wahrscheinlichkeit der Isolierung von STEC während der Lagerungsdauer abnehmen könnte. Falls notwendig, darf die Anreicherungskultur für eine Höchstdauer von 72 h bei (4 ± 1) °C gelagert werden. Eine längere Lagerungsdauer ist unter Umständen möglich, wenn sich bei der Verifizierung/Validierung des jeweiligen Probentyps keine negativen Auswirkungen auf die STEC-Isolierung ergeben.

Die Isolierung erfolgt durch Ausplattieren der positiven Anreicherungskultur auf mindestens zwei verschiedenen festen selektiven und/oder Differenzierungsmedien. Es ist unerlässlich, das bezogen auf *E. coli* selektive Trypton-Galle-X-Glucuronid-Agarmedium (TBX) als primäres Isolierungsmedium zu verwenden. Weitere zu verwendende feste Medien können vom Laboratorium frei gewählt werden; dabei sollten jedoch andere Selektions- und Differenzierungsprinzipien als der Nachweis der Beta-Glucuronidase mit Hilfe von X-Glucuronid berücksichtigt werden.

Die Unterscheidung zwischen STEC und kommensalen *E. coli* erfordert die Feststellung des Vorhandenseins von *stx*-Genen in einzelnen Kolonien. Das primäre Isolierungsmedium, TBX, ist ein für das Wachstum von *E. coli* geeignetes Medium, bei dem die Selektivität auf der Gegenwart von Gallensalzen und dem Nachweis der Beta-Glucuronidase-Aktivität beruht. STEC-Stämme können sich signifikant in ihrer Resistenz gegenüber anderen selektiven Stoffen als den Gallensalzen unterscheiden; dazu gehört auch die Variabilität zwischen Stämmen, die zur selben O-Gruppe gehören (siehe Literaturhinweise [21], [22], [23] und [24]).

Die meisten *E.-coli*-Stämme sind Beta-Glucuronidase-positiv und bilden blaue Kolonien auf TBX. Einige *E.-coli*-Stämme, insbesondere diejenigen, die zum Serotyp O157:H7 gehören, sind jedoch Beta-Glucuronidase-negativ. Daher sollten Kolonien mit abweichenden Merkmalen auf TBX, einschließlich der farblosen, auf das Vorliegen von *stx*-Genen untersucht werden. Der Anteil der untersuchten weißen Kolonien sollte 10 % der insgesamt vom TBX-Agar überimpften Kolonien betragen.

Die Verwendung verschiedener selektiver, chromogener und von Differenzierungsmedien wird dringend empfohlen. Bei der Isolierung bestimmter STEC-Stämme könnte die Verwendung von Cefixim und Tellurit enthaltenden (CT-)Platten von Nutzen sein, beispielsweise CT-Sorbitol-MacConkey-Agar für *E. coli* O157 und weitere STEC-Stämme. Nichtsdestotrotz zeigen nicht alle STEC-Stämme ein stabiles Wachstum in Gegenwart von Cefixim und Tellurit. Für die Isolierung von STEC O26 darf ein festes Differenzierungsmedium (MacConkey-Agar),

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

das Rhamnose anstelle von Lactose enthält (RMAC), verwendet werden, da die O26-Stämme von STEC üblicherweise Rhamnose nicht verwerten können, während andere *E.-coli*-Stämme dazu üblicherweise in der Lage sind. Enterohämolysin-Agarplatten sind nicht selektiv, können aber die Produktion von Beta-Hämolysin – ein Merkmal, das einige STEC-Stämme aufweisen – anzeigen.

Um gut isolierte Kolonien auf den Platten zu erhalten, ist das Ausstreichen mehrerer Verdünnungen der Anreicherungskultur erforderlich; dies wird auch als Verdünnungsverfahren bezeichnet. Der Bereich der auszustreichenden Verdünnungen hängt von der Hintergrund-Mikroflora der Untersuchungsprobe und davon, ob hoch selektive Medien (z. B. CT-SMAC) verwendet werden, ab. Es werden Verdünnungen bis zu 10^{-6} hergestellt und jeweils 100 µl der geeigneten Verdünnungen (z. B. 10^{-4}, 10^{-5} und 10^{-6}) auf TBX-Agar und auf mindestens einem weiteren, vom Laboratorium gewählten festen Medium ausgestrichen. Die Verdünnungen können in BPW, physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 9 g/l) oder Verdünnungsmittel für maximale Wiedergewinnung (Pepton 1 g/l, NaCl 8,5 g/l) hergestellt werden. Die angeimpften Agarplatten müssen für (21 ± 3) h bei (37 ± 1) °C bebrütet werden. Sollten zu wenig isolierte Kolonien erhalten werden, wird die Ausplattierung der Anreicherungsbouillon in verschiedenen Verdünnungen wiederholt, um diskrete Kolonien zu erreichen. Wenn vermutlich gestresste oder schlecht wachsende Zellen in der Probe vorhanden sind (z. B. gefrorene, getrocknete, mit UV oder Druck behandelte Lebensmittel), könnte es für eine erfolgreiche STEC-Isolierung notwendig sein, Verdünnungen von 10^{-2} und 10^{-3} auszuplattieren.

ANMERKUNG Die C_t-Werte können einen Hinweis auf die Platte mit der korrekten Verdünnung liefern, von der die Einzelkolonien zu entnehmen sind. Werden hohe C_t-Werte erhalten, zeigt dies relativ geringe Anzahlen von STEC in der Anreicherungskultur an, und dies könnte die Stammisolierung erschweren, wenn lediglich Kolonien von den Platten mit den 10^{-5}- und den 10^{-6}-Verdünnungen gewählt werden. Unter solchen Umständen ist es ratsam, auch einige typische *E.-coli*-Kolonien aus der oder den 10^{-4}-Verdünnungsplatte(n) auszuwählen, auch wenn sie möglicherweise nicht gut isoliert sind.

Es werden bis zu 50 typische/verdächtige Kolonien (mit *E.-coli*-Morphologie, Wachstum auf für *E. coli* geeignetem Medium) je Probe auf das Vorliegen von *stx*-Genen mittels konventioneller oder Real-time-PCR untersucht, wobei 50 % der Kolonien vom TBX-Agar und die übrigen von dem alternativen Medium oder einem anderen zusätzlich verwendeten Medium ausgewählt werden. Einzelne Kolonien werden auf der Grundlage verschiedener Koloniemerkmale der typischen und verdächtigen Kolonien von den verwendeten Plattierungsmedien aufgenommen, sodass die verschiedenen Koloniemerkmale in den insgesamt aufgenommenen 50 Kolonien vertreten sind.

Kolonien dürfen als Pools bestehend aus höchstens 10 Kolonien, jeweils in Wasser, untersucht werden (siehe nachfolgende Absätze). Wenn verschiedene Pools unterschiedliche *stx*-Muster aufweisen, sollten einzelne Kolonien aus allen *stx*-positiven Pools untersucht werden, um die Kolonie zu bestätigen. Wenn eine oder mehrere Kolonien mit einem *stx*-Profil ähnlich dem (den) Profil(en) des Pools nachgewiesen werden, kann das Verfahren beendet werden, selbst wenn weniger als 50 Kolonien getestet werden. Die untersuchten Kolonien müssen auf einer Nähragarplatte ausgestrichen und für mindestens 18 h und bis zu 24 h bei (37 ± 1) °C bebrütet werden, um eine weitere Charakterisierung zu ermöglichen.

Es gibt mehrere Arten von handelsüblichen Nähragarmedien, entweder in Form gebrauchsfertiger Platten oder im Laboratorium aus wasserfreiem Pulver hergestellt. Jede Art von nicht selektiven Nähragarmedien, z. B. Trypton-Soja-Agar (TSA), ist für die Gewinnung von Kolonien für die weitere Untersuchungen geeignet.

Die Auswahl der Kolonien und das Poolen für die Identifizierung *stx*-positiver Kolonien kann wie nachfolgend beschrieben durchgeführt werden. Die Kolonien werden unter Berücksichtigung der hoch variablen Koloniemerkmale von STEC ausgewählt (z. B. zeigen nicht alle STEC-Stämme, zum Beispiel STEC O157, eine Beta-Glucuronidase-Aktivität). Ein Teil einer einzelnen Kolonie wird mit einer sterilen 1-µl-Öse oder Nadel aufgenommen; ein nicht selektiver Agar, z. B. eine Nähragarplatte (die mit einem Raster gekennzeichnet wurde, um die einzelnen Kolonien einfacher verfolgen zu können) wird mit der Öse oder Nadel berührt (angeimpft). Das restliche Koloniematerial wird in einem Mikrozentrifugenröhrchen, das 300 µl bis 500 µl steriles Wasser von molekularbiologischem Reinheitsgrad (durch 0,22-µm-Membran filtriert) enthält, suspendiert. Der Vorgang wird wiederholt und die übrigen bis zu neun Kolonien eines Pools werden in dasselbe Mikrozentrifugenröhrchen suspendiert. Bei Anwendung der Real-time-PCR wird mit dem vom Laboratorium angewendeten DNA-Extraktionsverfahren fortgefahren. Bei Durchführung einer konventionellen PCR (z. B. nach dem in

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

Anhang E beschriebenen Protokoll) wird das Röhrchen für 10 min im siedenden Wasserbad erhitzt, um ein DNA-Template herzustellen.

Das DNA-Template aus den einzelnen Kolonien der positiven Pools wird jeweils wie zuvor beschrieben hergestellt. Die Standard-PCR-Protokolle in Anhang D oder Anhang E oder andere gleichwertige PCR-Protokolle werden angewendet, um das Vorhandensein von Virulenzgenen in den isolierten Kolonien zu bestätigen.

Wenn Gemüseproben, einschließlich Sprosse oder anderer Probenmaterialien mit einer säureempfindlichen Hintergrund-Flora, untersucht werden, darf die Isolierung von STEC durch Anwendung einer Säurebehandlung (pH 2,0 ± 0,2) unterstützt werden, um die Hintergrund-Mikroflora zu vermindern. Ein Protokoll für die Säurebehandlung zur Unterstützung der STEC-Isolierung bei Gemüseproben ist im informativen Anhang F bereitgestellt. Nach der Säurebehandlung wird ein Aliquot des Anreicherungsmediums ausgestrichen und bis zu 30 Kolonien werden zur Bestätigung des Vorhandenseins der *stx*-Gene ausgewählt. Wenn nach der pH-Behandlung STEC nicht von den Platten isoliert wird, muss das Laboratorium die Isolierung nach dem Verdünnungsverfahren versuchen und charakteristische Kolonien wie oben beschrieben bestätigen. Die Säurebehandlung und das Verdünnungsverfahren können entsprechend den Arbeitsabläufen des Laboratoriums parallel durchgeführt werden.

Sobald ein Stamm mit einem *stx*-Gen isoliert ist, sollte die Kolonie als *E. coli* bestätigt werden (z. B. durch Indolproduktion oder mit Hilfe von miniaturisierten Panels biochemischer Tests zur *E.-coli*-Identifizierung oder anderen nach ISO 7218 validierten Methoden).

ANMERKUNG Einige *E.-coli*-Stämme können Indol-negativ sein; daher ist es ratsam, wenn dieser Test zur Bestätigung eingesetzt und dabei ein negatives Ergebnis erhalten wird, den Stamm mit einem anderen *E.-coli*-Bestätigungstest weiter zu untersuchen.

Anhang C enthält ein Fließschema, in dem das STEC-Isolierungsverfahren beschrieben ist.

10 Auswertung

Proben, die in Bezug auf *stx*-Gene in der Anreicherungskultur negativ sind, werden hinsichtlich des Vorhandenseins von STEC als negativ angesehen. **Ein positives Ergebnis der Form „STEC nachgewiesen“ wird ausschließlich auf der Grundlage des Isolierungsschritts angegeben. Ein positives Ergebnis beim Screening wird im endgültigen Ergebnis nicht angegeben, und wenn stx-Gene im Screening-Schritt nachgewiesen werden, der Isolierungsschritt aber nicht erfolgreich ist, muss als Ergebnis „STEC nicht nachgewiesen“ angegeben werden (9.4)**. Entsprechend der Auswertung der Ergebnisse wird angegeben: In einer Einwaage von *x* g oder *x* ml des Produkts oder auf der Abstrichfläche oder in einem Gesamtobjekt (z. B. Socken) wurde „STEC nachgewiesen“ oder wurde „STEC nicht nachgewiesen“. Ein Schema für die Angabe des Ergebnisses ist in der folgenden Tabelle bereitgestellt:

Erhaltenes Ergebnis	**Angabe des Ergebnisses**
Negative Ergebnisse: Proben sind beim Screening in Bezug auf *stx* negativ oder Proben sind beim Screening positiv, aus ihnen wurden STEC jedoch nicht isoliert.	**STEC wurden in der Einwaage von x g oder x ml des Produkts oder auf der Abstrichfläche oder in den gesamten Objekten (z. B. Socken) nicht nachgewiesen.**
Positive Ergebnisse: STEC-Kulturen wurden aus der Probe isoliert.	**STEC wurden in der Einwaage von x g oder x ml des Produkts oder auf der Abstrichfläche oder in den gesamten Objekten (z. B. Socken) nachgewiesen.**

Bei besonderen Anforderungen, beispielsweise auf besondere Anforderung des Kunden, kann das nur beim Screening-Schritt positive Ergebnis des Vorhandenseins von *stx*-Genen im Anmerkungen-Feld wie folgt angegeben werden: „Identifizierung von *stx*-kodierenden Genen in der Anreicherungskultur der Probe“.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

11 Validierung des Verfahrens

Die in dieser Norm beschriebenen Anreicherungsbedingungen (insbesondere die Anwendung von (41,5 ±1) °C als Bebrütungstemperatur) wurden in einem Ringversuch, der vom EURL für *E. coli* 2018 organisiert wurde, bewertet. Diese Studie wurde parallel zu der Anwendung von ISO/TS 13136:2012 bei PT21 zum Nachweis von STEC in Radieschensprossen durchgeführt. Insgesamt 48 Laboratorien, darunter 31 nationale Referenzlaboratorien (NRLs) für *E. coli* sowie 17 amtliche Laboratorien in Italien, nahmen an der freiwilligen Studie teil. Die Studie beinhaltete den Nachweis und die Isolierung von STEC O26, die in unterschiedlichen Mengen in Sprossen vorhanden sind, durch Anwendung von BPW als Anreicherungsmedium und der Bebrütungstemperatur von 41,5 °C. Die Ergebnisse wurden mit den bei PT21 erhaltenen, wobei die Proben bei 37 °C angereichert worden waren, verglichen, um die Auswirkung der erhöhten Anreicherungstemperatur bei der Anwendung von ISO TS 13136:2012 zu beurteilen. Die Bewertung des Verfahrens für die Kombination STEC O26/Sprossen ergab folgende Leistungsmerkmale:

Tabelle 1 — Empfindlichkeit der Real-time-PCR-Assays für *stx1*/*stx2* nach Bebrütung von Anreicherungskulturen bei zwei Temperaturen (Screening-Schritt)

	Anreicherung bei (37 ± 1) °C		Anreicherung bei (41,5 ± 1) °C	
	stx1	***stx2***	***stx1***	***stx2***
Se (niedrige Konzentration von 2 KBE/g)	93,9 %	97,9 %	100 %	100 %
Se (hohe Konzentration von 20 KBE/g)	97,9 %	97,9 %	100 %	100 %

Tabelle 2 — Für den Isolierungsschritt berechnete Empfindlichkeit

	Isolierung nach Anreicherung bei (37 ± 1) °C	Isolierung nach Anreicherung bei (41,5 ± 1) °C
Se (geringe Konzentration)	73,3 %	92,2 %
Se (hohe Konzentration)	80,7 %	94 %

Die LOD_{50} für den Isolierungsschritt, berechnet nach Literaturhinweis [25], war deutlich niedriger, wenn die Anreicherung bei (41,5 ± 1) °C (1,7 KBE/g) durchgeführt wurde, verglichen mit der Anreicherung bei (37 ± 1) °C (5,4 KBE/g). Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die in diesem Ringversuch angewendeten Anreicherungsbedingungen als wirksam bei der Verbesserung der Isolierung des in dieser Studie verwendeten Stamms STEC O26 erwiesen haben.

12 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss die folgenden Angaben enthalten:

— das angewendete Prüfverfahren mit Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO 13136-1;

— das verwendete Probenahmeverfahren, wenn bekannt;

— die Größe der Prüfmenge (Einwaage) und/oder die Art der untersuchten Objekte (nur bei Nachweisverfahren);

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03

— alle in diesem Dokument nicht festgelegten oder als optional angesehenen Betriebsbedingungen, einschließlich Einzelheiten zu allen Vorkommnissen, die das (die) Untersuchungsergebnis(se) beeinflusst haben könnten;

— jegliche Abweichungen von diesem Dokument;

— alle Informationen, die für die vollständige Identifizierung der Probe erforderlich sind;

— das (die) erhaltene(n) Untersuchungsergebnis(se);

— das Datum der Untersuchung.

13 Qualitätssicherung

Das Labor sollte ein klar festgelegtes Qualitätslenkungssystem haben, um sicherzustellen, dass Geräte, Reagenzien und Techniken für das Verfahren geeignet sind und die allgemeinen Anforderungen von ISO 7218 erfüllen. Die Verwendung von Positivkontrollen, Negativkontrollen und Blindproben ist Teil des Verfahrens. Die Leistungsprüfung von Nährmedien ist in Abschnitt B.1 festgelegt und in ISO 11133 beschrieben.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 13136-1:2024-03