

	DIN EN ISO 13136-2	
ICS 07.100.30	Entwurf	Einsprüche bis 2024-04-16 Vorgesehen mit E DIN EN ISO 13136-1:2024-03 als Ersatz für DIN CEN ISO/TS 13136 (DIN SPEC 10794):2013-04
Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Nachweis, Isolierung und Charakterisierung von Shiga-Toxin bildenden <i>Escherichia coli</i> (STEC) – Teil 2: Horizontales Verfahren zur Charakterisierung von Shiga-Toxin bildenden <i>Escherichia coli</i> (STEC) Isolaten (ISO/DIS 13136-2:2024); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 13136-2:2024 Microbiology of the food chain – Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) – Part 2: Horizontal method for the characterization of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) isolates (ISO/DIS 13136-2:2024); German and English version prEN ISO 13136-2:2024 Microbiologie de la chaîne alimentaire – Recherche, isolement et caractérisation des <i>Escherichia coli</i> producteurs de shigatoxines (STEC) – Partie 2: Méthode horizontale pour la caractérisation des isolats d'<i>Escherichia coli</i> producteurs de shigatoxines (STEC) (ISO/DIS 13136-2:2024); Version allemande et anglaise prEN ISO 13136-2:2024 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 53 Seiten DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)		

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 13136-2:2024) 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 11133	siehe	DIN EN ISO 11133
ISO 22118	siehe	DIN EN ISO 22118
ISO 22119	siehe	DIN EN ISO 22119
ISO 22174	siehe	DIN EN ISO 22174
ISO 23418:2022	siehe	DIN EN ISO 23418:2022-09

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) Beschreibung der Charakterisierung von STEC-Isolaten im Hinblick auf die Bestimmung des Vorhandenseins einer Reihe von Virulenzgenen und Serogruppen sowie der Subtypisierung von Stx-Genen hinzugefügt.

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 11133, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

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 EN ISO 23418:2022-09, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Gesamtgenomsequenzierung zur Typisierung und genomischen Charakterisierung von Bakterien — Allgemeine Anforderungen und Leitfaden (ISO 23418:2022); Deutsche Fassung EN ISO 23418:2022*

– Leerseite –

Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Nachweis, Isolierung und Charakterisierung von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) – Teil 2: Horizontales Verfahren zur Charakterisierung von Shiga-Toxin bildenden *Escherichia coli* (STEC) Isolaten (ISO/DIS 13136-2:2024)

Microbiology of the food chain – Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) – Part 2: Horizontal method for the characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates (ISO/DIS 13136-2:2024)

Microbiologie de la chaîne alimentaire – Recherche, isolement et caractérisation des *Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) – Partie 2: Méthode horizontale pour la caractérisation des isolats d'*Escherichia coli* producteurs de shigatoxines (STEC) (ISO/DIS 13136-2:2024)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	9
4 Kurzbeschreibung	9
5 Nährmedien und Reagenzien	10
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien	10
7 Probenahme	11
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	11
9 Durchführung	12
9.1 Subtypisierung der <i>stx</i> -Gene	12
9.1.1 Vorbereitung des PCR-Templates	12
9.1.2 Durchführung der PCR-Reaktion	12
9.1.3 Agarose-Gelelektrophorese	12
9.2 Untersuchung auf Vorhandensein des <i>eae</i> - und des <i>aggR</i> -Gens	13
9.2.1 Vorbereitung des PCR-Templates	13
9.2.2 Amplifikation mittels Real-time-PCR	13
9.2.3 Auswertung von Real-time-PCR-Ergebnissen	13
9.2.4 Interne Amplifikationskontrolle bei der Real-time-PCR	14
9.3 Bestimmung der Serogruppen O157, O26, O103, O145, O111, O45 und O121 durch Amplifikation der O-assoziierten Gene mittels Real-time-PCR	14
10 Auswertung	14
11 Untersuchungsbericht	15
12 Qualitätssicherung	15
Anhang A (informativ) Übersicht über das Verfahren	16
Anhang B (normativ) Nährmedien und Reagenzien	17
B.1 Allgemeines	17
B.2 Nähragar (Beispiel für ein nicht selektives Medium)	17
B.2.1 Zusammensetzung	17
B.2.2 Herstellung	17
B.2.3 Herstellung der Nähragarplatten	17
B.3 Trypton-Soja-Bouillon (Beispiel für eine nicht selektive flüssige Bouillon)	18
B.3.1 Zusammensetzung	18
B.3.2 Herstellung von TSB	18
Anhang C (informativ) Durchführung der PCR-Reaktionen für die Subtypisierung der <i>stx</i> -Gene . .	19
Anhang D (informativ) Primer und Sonden für die Real-time-PCR-Assays zum Nachweis des <i>eae</i> - und <i>aggR</i> -Gens	22
Anhang E (informativ) Primer und Sonden für die Real-time-PCR-Assays zum Nachweis der O-assoziierten Gene	23
Literaturhinweise	25

Tabellen

Tabelle B.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien und Reagenzien	18
Tabelle C.1 — PCR-Primer	20
Tabelle C.2 — Liste der Referenzstämme, die die <i>stx</i> -Gen-Subtypen besitzen	21
Tabelle D.1 — Real-time-PCR-Primer und -Sonden	22

Tabelle E.1 — Real-time-PCR-Primer und -Sonden (angepasst aus EURL-VTEC_Method_11 — https://www.iss.it/documents/5430402/0/EURL-VTEC_Method_11_Rev_1.pdf/ d7776894-60ef-e2ac-0244-665b5fcf5fc2?t=1619466344421)	23
Tabelle E.2 — <i>E.-coli</i>-Referenzstämme, die zu dem jeweiligen Ziel-Gen der 7 Serogruppen dieses Verfahrens gehören	24

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 13136-2:2024) 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 13136-2:2024 wurde von CEN als prEN ISO 13136-2:2024 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

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).

ISO weist auf die Möglichkeit hin, dass die Anwendung dieses Dokuments mit der Verwendung eines oder mehrerer Patente verbunden sein kann. ISO bezieht jedoch in dieser Hinsicht keinerlei Stellung bezüglich Nachweis, Gültigkeit oder Anwendbarkeit jeglicher beanspruchten Patentrechte. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments lag ISO [eine/keine] Mitteilung über ein Patent bzw. mehrere Patente vor, welche/s zur Umsetzung dieses Dokuments erforderlich sein könnte/n. Anwender werden jedoch darauf hingewiesen, dass dies möglicherweise nicht der aktuelle Informationsstand ist. Dieser kann jedoch der Patentdatenbank unter www.iso.org/patents entnommen werden. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

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 zweite Ausgabe ersetzt zusammen mit ISO 13136-1 die erste Ausgabe (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)
- Beschreibung der Charakterisierung von STEC-Isolaten in Bezug auf die Bestimmung des Vorhandenseins eines Satzes von Virulenzgenen und Serogruppen und die Subtypisierung von *stx*-Genen

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.

Einleitung

Shiga-Toxin (Stx) bildende *Escherichia coli* (STEC) sind Pathogene, die beim Menschen schwere Erkrankungen hervorrufen können, unter anderem hämorrhagische Colitis (HC) und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS).

Die Stx sind der definitive Virulenzfaktor von STEC und sie gehören zu einer heterogenen Familie von AB₅-Toxinen, einschließlich der beiden antigenisch unterschiedlichen Typen, Stx1 und Stx2. STEC sind Träger des Gens *stx1* und/oder des Gens *stx2*. Es ist eine große Variabilität in den *stx*-Gensequenzen beschrieben worden, und sowohl *stx1* als auch *stx2* können in mehrere Subtypen unterteilt werden, wobei bei einigen dieser Subtypen ein stärkerer Zusammenhang zu den schwersten Formen einer STEC-Infektion besteht (Literaturhinweise [1], [2]). Über 180 Serogruppen von *E. coli* sind identifiziert worden (Literaturhinweis [3]), und eine kleine Gruppe dieser Serogruppen ist in der Vergangenheit mit STEC-Stämmen, die ein größeres Problem für die öffentliche Gesundheit darstellen, in Zusammenhang gebracht worden, da sie häufig aus Patienten mit den schwersten Formen der Infektion isoliert werden (Literaturhinweis [4]). Nichtsdestotrotz ist das Spektrum der STEC-Serogruppen, die mit menschlichen Erkrankungen assoziiert sind, wesentlich breiter und entwickelt sich ständig weiter; so wurden in der neueren wissenschaftlichen Literatur alle STEC-Isolate als humanpathogen angesehen, da sie das Potential aufweisen, zumindest eine Diarrhoe (Durchfall) zu verursachen (Literaturhinweis [5]).

Neben der Serogruppe wurden weitere Marker der STEC beschrieben, die mit HC- und HUS-Fällen in Zusammenhang gebracht wurden, beispielsweise die als Locus of Enterocyte Effacement (LEE) bezeichnete Pathogenitätsinsel (angezeigt durch das Vorhandensein des *eae*-Gens, welches das Adhäsin Intimin kodiert) oder, vor kurzem, die Determinanten der enteroaggregativen Adhäsion, welche typischerweise in den enteroaggregativen *E. coli* vorkommen (Literaturhinweise [5], [6]). Derartige Merkmale, insbesondere das *eae*-Gen, werden neuerdings als STEC-Infektionen verschlimmernde Faktoren angesehen, die aber für das Auftreten schwerer Erkrankungsformen möglicherweise nicht unbedingt erforderlich sind (Literaturhinweis [5]). Darüber hinaus wird auch weiterhin eine größere Vielfalt in den genetischen Merkmalen, die mit der Pathogenität von STEC in Zusammenhang stehen, beschrieben, unter anderem Stämme, die Träger von Virulenzfaktoren sind, welche mit mehr als einem *E.-coli*-Pathotyp assoziiert sind, die als Hybrid- oder Kreuz-Pathotyp-Stämme bezeichnet werden (Literaturhinweise [7] bis [9]). Dies unterstreicht die Heterogenität dieser *E.-coli*-Pathogruppe und den Bedarf an einer detaillierteren Charakterisierung der Isolate.

In der vorliegenden Norm wird ein Verfahren zur Charakterisierung von STEC-Isolaten, die entweder durch Anwendung von ISO 13136-1 oder durch ein anderes Verfahren erhalten wurden, beschrieben. Die Charakterisierung beinhaltet die Bestimmung der folgenden Merkmale:

den Subtyp der Stx-kodierenden Gene

- das Vorhandensein der Gene *eae* und *aggR*, die an der Besiedelung eines Wirts durch STEC beteiligt sind;
- die Serogruppe.¹

In diesem Normverfahren wurde die folgende Nomenklatur angewendet:

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

Stx: Shiga-Toxin (gleichbedeutend mit VT);

STEC: Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli* (gleichbedeutend mit VTEC: Verocytotoxin bildende *Escherichia coli*), *E.-coli*-Stämme, die Stx-kodierende Gene besitzen;

1 Die von den in dieser Norm festgelegten Verfahren betroffenen Serogruppen sind O157, O26, O111, O145 und O103 (in der Vergangenheit auch als „Top-5“-Serogruppen bezeichnet) sowie O45 und O121 (die zusammen mit den vorgenannten fünf Serogruppen häufig bei Patienten mit STEC-Infektion in den Vereinigten Staaten isoliert werden).

eae: Gen, das das Adhäsins Intimin kodiert, welches die Adhäsion des Typs „Attaching and Effacing“ (Anheftung und Auslöschung) verursacht;

aggR: Gen, das den Transkriptionsaktivator AggR kodiert, der verschiedene an der enteroaggregativen Adhäsion beteiligte Faktoren aktiviert;

stx1a, *stx1c*, *stx1d*: Gene, die die drei entsprechenden Subtypen von *stx1* kodieren;

stx2a, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*: Gene, die Subtypen von *stx2* kodieren.

Die im Vorwort aufgezählten technischen Änderungen gegenüber ISO/TS 13136:2012, die in diesem Dokument eingeführt werden, gelten als erheblich (siehe ISO 17468). Diese technischen Änderungen haben einen erheblichen Einfluss auf die Leistungsmerkmale des Verfahrens.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument gilt für Reinkulturen von STEC. Die vorliegende Norm beschreibt die Charakterisierung von STEC-Stämmen, die aus beliebiger Quelle isoliert wurden. Insbesondere bezieht sich die hier beschriebene Charakterisierung von STEC-Stämmen auf:

- Subtypisierung der Stx-kodierenden Gene;
- Feststellung des Vorhandenseins des *eae*-Gens;
- Feststellung des Vorhandenseins des *aggR*-Gens;
- Feststellung des Vorhandenseins von Genen, die mit folgenden Serogruppen assoziiert sind: O157, O26, O111, O103, O145, O121 und O45.

Die vollständige Charakterisierung der isolierten STEC-Stämme wird erreicht, indem alle hier beschriebenen Module durchgeführt werden. Der Ablauf der Charakterisierung ist nicht aufeinanderfolgend, und die verschiedenen Module können auf der Grundlage spezifischer Erfordernisse getrennt implementiert werden (z. B. aufgrund behördlicher Anforderungen oder auf Anforderung der zuständigen Stelle oder des Kunden). Alternative Verfahren dürfen angewendet werden, unter anderem auch die Gesamtgenomsequenzierung (WGS, en: whole genome sequencing), vorausgesetzt diese Verfahren werden nach dem einschlägigen Teil der Normenreihe ISO 16140 validiert.

WARNUNG Zum Schutz der Gesundheit des Laborpersonals ist es unerlässlich, dass Prüfungen zum Nachweis und zur Charakterisierung von STEC nur in Laboratorien mit geeigneter Ausstattung und durch qualifizierte Mikrobiologen erfolgen und dass bei der Entsorgung aller Materialien, die möglicherweise mit Bakterienkulturen in Kontakt gekommen sind, 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, geeignete Sicherheits- und Gesundheitsvorschriften zu erarbeiten und in Bezug auf den Umgang mit und die Einkapselung von biologischen Arbeitsstoffen in Übereinstimmung mit nationalen und internationalen Vorschriften zu arbeiten.

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 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*

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

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 23418:2022, *Microbiology of the food chain — Whole genome sequencing for typing and genomic characterization of bacteria — General requirements and guidance*

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:

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

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

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Shiga-Toxin bildende *Escherichia coli* (STEC)

E. coli-Stämme, die ein oder mehrere Stx-kodierende Gene (*stx*) besitzen

3.2

stx1* und *stx2

Gene, die Stx1 bzw. Stx2 kodieren

3.3

eae

Gen, das das Adhäsin Intimin kodiert und im Locus of Enterocyte Effacement (LEE) lokalisiert und ein Schlüsselfaktor für den „Attaching and Effacing“-Besiedelungsmechanismus ist

3.4

aggR

Gen, das den Transkriptionsaktivator AggR kodiert, der verschiedene an der enteroaggregativen Adhäsion beteiligte Faktoren, welche für enteroaggregative *E. coli* (EAEC) charakteristisch sind, aktiviert. EAEC sind eine Pathogruppe von diarrhöischen *E. coli*, und über Hybridstämme von EAEC/STEC liegen Berichte im Zusammenhang mit schweren Erkrankungen vor, zum Beispiel über STEC O104:H4, der 2011 für einen großen Krankheitsausbruch in der EU verantwortlich war.

3.5

***stx*-Gen-Subtypen**

die beiden antigenisch unterschiedlichen Typen von Stx, Stx1 und Stx2, werden jeweils in verschiedene Subtypen eingeteilt, und zwar drei Subtypen von Stx1 (Stx1a, Stx1c und Stx1d) und in mindestens sieben Subtypen von Stx2 (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f und Stx2g) (Literaturhinweis [1]). Neue Stx-Subtypen werden fortlaufend identifiziert, unter anderem Stx1e, Stx2h, Stx2i, Stx2j, Stx2k, Stx2l, Stx2m und Stx2o (Literaturhinweise [10] bis [14]). Die vorliegende Norm bezieht sich auf die Bestimmung der drei Subtypen des *stx1*-Gens (*stx1a*, *stx1c* und *stx1d*) sowie der sieben Subtypen *stx2a* bis *stx2g* des *stx2*-Gens.

3.6

O-Antigen

Serogruppen, oder „O“-Antigene, werden durch Zahlen gekennzeichnet und werden zum Zeitpunkt der Erstellung dieses Dokuments von 1 bis 188 durchgezählt, jedoch wird die Liste der Serogruppen kontinuierlich aktualisiert.

4 Kurzbeschreibung

Das festgelegte Verfahren umfasst die folgenden drei Module zur Charakterisierung:

- Subtypisierung des Stx-kodierenden Gens (Feststellung des Vorhandenseins von *stx1a*, *stx1c*, *stx1d*; *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*) – auf der Grundlage von PCR;
- Feststellung des Vorhandenseins des Gens *eae*, das an der Bakterien-Adhäsion des „Attaching and Effacing“-Typs beteiligt ist – auf der Grundlage von Real-time-PCR;
- Feststellung des Vorhandenseins des Gens *aggR*, das an der Besiedelung durch enteroaggregative *E. coli* beteiligt ist – auf der Grundlage von Real-time-PCR;
- Feststellung des Vorhandenseins von Genen, die mit den Serogruppen O157, O26, O111, O103, O145, O45 und O121 assoziiert sind – auf der Grundlage von Real-time-PCR.

Im Einzelnen wird jeweils DNA aus einer einzelnen Kolonie extrahiert und mittels PCR oder Real-time-PCR analysiert, je nachdem welcher Assay durchgeführt wird. Die vollständige Charakterisierung eines STEC-Isolats wird erreicht, indem alle diese Assays durchgeführt werden; nichtsdestotrotz sind die verschiedenen Bestimmungen nicht alle normativ und dürfen als Reaktion auf spezifische Anforderungen, d. h. auf der Grundlage der Anforderungen der Kunden (einschließlich der Anforderung der zuständigen Stelle oder aufgrund von behördlichen Anforderungen) separat durchgeführt werden.

Eine schematische Darstellung der verschiedenen Module des Verfahrens ist in Anhang A dargestellt.

Alternative methodische Ansätze, die sich von den in diesem Dokument beschriebenen unterscheiden, dürfen die auf Objektträger oder in Mikrotiterplatten durchgeführte Agglutinierung zur Bestimmung der Serogruppe oder die Gesamtgenomsequenzierung (WGS) zur umfangreichen Charakterisierung von Stämmen beinhalten. Wenn die WGS angewendet wird, muss „ISO 23418:2022 Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Gesamtgenomsequenzierung zur Typisierung und genomischen Charakterisierung von Bakterien — Allgemeine Anforderungen und Leitfaden“ angewendet werden, um die WGS-Daten der STEC-Stämme und die daran anschließende bioinformatische Analyse zu erhalten.

Die auf WGS beruhenden Feststellungen des Vorhandenseins der Virulenzgene müssen ebenso wie die *stx*-Subtypisierung und Bestimmung der Serogruppe durch Analysieren der erhaltenen Sequenzen erfolgen. Für die Analyse der STEC-Genomsequenzen stehen verschiedene Softwareprogramme zur Verfügung, entweder als handelsübliche Software oder über öffentlich zugängliche Webserver (z. B. <https://aries.iss.it/> und <https://cge.cbs.dtu.dk/services/>). Unabhängig von der verwendeten Software sollten die zu den durchgeführten Analysen gehörenden Logdateien (die, zum Beispiel, Informationen über die Virulenzgene oder mit den Serogruppen assoziierten Gene und die verwendeten Datenbanken enthalten) als Bestandteil der Rohdaten gespeichert werden. Bei der Durchführung einer WGS wird empfohlen, die für die DNA-Reinigung angeimpfte Kolonie erneut auf das Vorhandensein von *stx* zu prüfen, da *stx*-Phagen während der Kultivierung verloren gehen könnten.

5 Nährmedien 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

Laborgeräte zum einmaligen Gebrauch oder Verbrauchsartikel aus Kunststoff mit geeigneten Kennwerten sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten. Übliche Ausrüstungen eines mikrobiologischen Labors (siehe ISO 7218) wird benötigt, und insbesondere Folgendes:

- 6.1 Wasserbad oder Heizblock**, das/der bei Temperaturen bis zu 100 °C gehalten werden kann.
- 6.2 Brutschrank**, der bei $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ gehalten werden kann.

6.3 Gerätschaften für die Nukleinsäureextraktion. Geeignete Ausrüstung in Übereinstimmung mit dem angewendeten Verfahren (wenn notwendig).

6.4 Pipetten für unterschiedliche Volumina (zwischen 1 µl und 1 000 µl, siehe ISO 7550 [7]).

6.5 Dünnwandige Mikroröhrchen für Real-time-PCR, PCR-Multi-Well-Mikrotiterplatten oder andere geeignete, lichtdurchlässige Kunststoffbehältnisse zum einmaligen Gebrauch.

6.6 Real-time-PCR-Gerät (zum Nachweis von *eae* und *aggR*, Nachweis von Serogruppen) Thermocycler mit einem Detektor 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 (für *stx*-Subtypisierung) und PCR-Mikroröhrchen. Es sind Geräte unterschiedlicher Hersteller verfügbar, die in Übereinstimmung mit den Grundsätzen des Laboratoriums verwendet werden können.

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

6.10 Gerät für die Trockensterilisation (Heißluft-Sterilisator) oder Dampfsterilisation (Autoklav). Wie in ISO 7218 festgelegt.

6.11 Trocken- oder belüfteter Wärmeschrank, der auf einer Temperatur im Bereich zwischen 25 °C und 50 °C gehalten werden kann, oder eine Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom zum Trocknen der Platten (falls notwendig).

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

6.13 Tiefkühltank (zur Lagerung von DNA und PCR-Reagenzien), auf (-18 ± 3) °C einstellbar.

6.14 pH-Messgerät, bei 25 °C auf 0,01 pH-Einheiten ablesbar, ermöglicht Messungen mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ pH-Einheiten.

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

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

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

6.17 Wasserbad, auf 47 °C bis 60 °C einstellbar.

6.18 Laminarbox.

6.19 Werkbank für PCR.

6.20 Elektrophoresegerät.

7 Probenahme

Die Probenahme wird in diesem Dokument nicht festgelegt. Dieses Dokument ist anwendbar auf STEC, die aus beliebiger Quelle durch Anwendung von ISO 13136-1 oder nach anderen Verfahren isoliert wurden.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Das Verfahren besteht in der Charakterisierung von isolierten STEC-Stämmen. Die Probenvorbereitung besteht aus der Reinigung der Nukleinsäure für die daran anschließende Charakterisierung oder für einige Anwendun-

gen (z. B. Serotypisierung durch Agglutinierung), die mit dem Stamm selbst durchgeführt werden. Die Vorbereitung der Untersuchungsprobe wird in den spezifischen Charakterisierungsmodulen, die in diesem Dokument enthalten sind, beschrieben.

9 Durchführung

9.1 Subtypisierung der *stx*-Gene

Dieses Verfahren wird angewendet, um die Subtypen des *stx*-Gens in isolierten *E.-coli*-Stämmen zu bestimmen, in denen das Vorhandensein von *stx1* und/oder *stx2*, z. B. durch das in ISO 13136-1 beschriebene Verfahren, bereits nachgewiesen worden ist. Die Bestimmung der *stx*-Subtypen erfolgt durch spezifische PCR-Reaktionen mit Primern, die aufgrund von Analysen der *stx*-Sequenzen entwickelt wurden (Literaturhinweis [1]) und in Anhang C, Tabelle C.1 angegeben sind.

Das Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

- Vorbereitung des PCR-Templates;
- Durchführung der PCR-Reaktion;
- Bestimmung der PCR-Ergebnisse mit horizontaler Agarose-Gelelektrophorese.

9.1.1 Vorbereitung des PCR-Templates

Eine einzelne Bakterienkolonie des STEC-Stamms wird aus einem festen Medium (z. B. Nähragar oder chromogener Agar) aufgenommen, in TSB überimpft und für (18 ± 3) h bei 37 °C bebrütet. Ein Volumen von 25 µl der Übernachtskultur wird in einem Mikrozentrifugenröhrchen zu 975 µl sterilem Wasser von molekularbiologischem Reinheitsgrad hinzugefügt. Das Röhrchen wird für 15 min in kochendes Wasser gegeben und anschließend 5 min bei 18 000 g zentrifugiert. Der Überstand kann nach Überführen in ein sauberes Mikrozentrifugenröhrchen direkt als Template für die PCR eingesetzt oder für weitere Analysen bei –20 °C gelagert werden.

9.1.2 Durchführung der PCR-Reaktion

PCR-Assays werden in einem Gesamtvolumen von 25 µl für Triplex-PCR-Assays (zum Nachweis der *stx1*-Subtypen) und in 20 µl für Einzel-PCR-Assays (zur *stx2*-Subtypisierung) angesetzt, wie in Anhang C, Tabelle C.1 beschrieben. Es wird eine Stammlösung der Primer mit der Konzentration von jeweils 5 µM angesetzt und 5 µl werden für Überstände des Lysats nach Hitzeabtötung verwendet (die Template-Stammlösung wird wie oben in 7.1.1 beschrieben hergestellt). Mit sterilem Wasser von molekularbiologischem (oder gleichwertigem) Reinheitsgrad wird jeweils auf das Endvolumen von 20 µl bzw. 25 µl aufgefüllt. Die Primer und die Bedingungen für die PCR sind in Anhang C angegeben. PCR-Kontrollen, einschließlich Positiv- und Negativkontrollen, müssen bei jedem Assay durchgeführt werden. Informationen zu den Referenzstämmen können Anhang C, Tabelle C.2 entnommen werden.

WICHTIG Die Verwendung einer *Taq*-Polymerase ist zwingend erforderlich, um die Möglichkeit, nicht spezifische Amplifikate zu erhalten, zu vermeiden. Die hier beschriebenen Bedingungen sind bei Verwendung einer Hot-Start-*Taq*-Polymerase bestimmt worden. Die spezifischen Bedingungen der PCR-Analyse können in jedem Labor Anpassungen erfordern, indem die Bestimmungen der *stx*-Subtypen anhand eines Satzes von Referenzstämmen durchgeführt werden (siehe Anhang C, Tabelle C.2).

9.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Amplifikationsprodukte werden auf einem Agarose-Gel sichtbar gemacht. Dieses Gel kann entweder laborintern hergestellt oder gebrauchsfertig beschafft werden, vorausgesetzt dass die Konzentration der Agarose für den Größenbereich der Amplifikate geeignet ist.

Bei der Herstellung des Agarose-Gels im Labor wird dieses Verfahren befolgt: