

DIN EN ISO 21872



ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2016-05-25

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Horizontales Verfahren zum Nachweis von potentiell enteropathogenen
Vibrio parahaemolyticus, *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus*
(ISO/DIS 21872:2016);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 21872:2016**

Microbiology of the food chain –
Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*,
Vibrio cholerae and *Vibrio vulnificus* (ISO/DIS 21872:2016);
German and English version prEN ISO 21872:2016

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale pour la recherche des espèces potentiellement entéropathogènes *Vibrio*
parahaemolyticus, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* (ISO/DIS 21872:2016);
Version allemande et anglaise prEN ISO 21872:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-03-25 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de 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/stellungnahme 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 (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 85 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 21872:2016) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalyse — Horizontale Verfahren“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

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

Die Internationale Norm ISO 21872:2016 ist vorgesehen als Ersatz für die Technische Spezifikationen ISO/TS 21872-1:2007 und ISO/TS 21872-2:2007.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN ISO 21872 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 6887	siehe DIN EN ISO 6887
ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 11133	siehe DIN EN ISO 11133
ISO 22174	siehe DIN EN ISO 22174
ISO 22118	siehe DIN EN ISO 22118
ISO 22119	siehe DIN EN ISO 22119

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 6887, *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 22174, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe*

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*

— Leerseite —

Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis von potentiell enteropathogenen *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus* (ISO/DIS 21872:2016)

*Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche des espèces potentiellement entéropathogènes *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* (ISO/DIS 21872:2016)*

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* (ISO/DIS 21872:2016)*

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.7g

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Vorwort	6
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Grundsatz	9
4.1 Allgemeines	9
4.2 Primäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium	9
4.3 Sekundäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium	9
4.4 Isolierung und Identifizierung	10
4.5 Bescheinigung	10
5 Nährmedien und Reagenzien	10
5.1 Anreicherungsmedium: alkalisches Peptonwasser (APW)	10
5.2 Festes selektives Isolierungsmedium	10
5.2.1 Erstes Medium: Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar (TCBS-) -Medium	10
5.2.2 Zweites Medium	11
5.3 Kochsalz-Agar (SNA)	11
5.4 Reagenz für den Nachweis von Oxidase	11
5.5 Biochemische Prüfungen	11
5.6 PCR	12
6 Geräte und Glaswaren	12
7 Probenahme	13
8 Probenvorbereitung	13
9 Verfahrensanweisung	13
9.1 Untersuchungsprobe und Erstverdünnung	13
9.2 Primäre selektive Anreicherung	14
9.3 Sekundäre selektive Anreicherung	15
9.4 Isolierung und Identifizierung	15
9.5 Bescheinigung	16
9.5.1 Allgemeines	16
9.5.2 Auswahl der Kolonien zur Bestätigung und Vorbereitung von Reinkulturen	16
9.5.3 Prüfungen zur präsumptiven Identifizierung	17
9.5.4 Biochemische Bestätigung	17
9.5.5 PCR-Bestätigung	19
9.5.6 DNA-Extraktion	20
9.5.7 Konventionelle PCR	20
9.5.8 Real-time-PCR	21
10 Angabe der Ergebnisse	22
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens	22
11.1 Ringversuch	22
11.2 Prüfempfindlichkeit	22

11.3	Spezifität.....	22
11.4	LOD50	22
12	Prüfbericht.....	22
Anhang A (normativ) Verfahrensdiagramm		23
Anhang B (normativ) Zusammenstellung und Vorbereitung des Nährmediums und der Reagenzien.....		25
B.1	Alkalisches Peptonwasser (APW)	25
B.1.1	Zusammenstellung.....	25
B.1.2	Vorbereitung.....	25
B.2	Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar (TCBS-).....	25
B.2.1	Zusammenstellung.....	25
B.2.2	Vorbereitung.....	26
B.2.3	Vorbereitung der Agarplatten	26
B.3	Kochsalz-Agar (SNA)	26
B.3.1	Zusammenstellung.....	26
B.3.2	Vorbereitung.....	26
B.3.3	Vorbereitung der Agarplatten	26
B.3.4	Vorbereitung der Agarschräglflächen.....	26
B.4	Reagenz für den Nachweis von Oxidase.....	27
B.4.1	Zusammenstellung.....	27
B.4.2	Vorbereitung.....	27
B.5	Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC)	27
B.5.1	Zusammenstellung.....	27
B.5.2	Vorbereitung.....	27
B.6	Arginin-Dehydroxylase-Salzmedium (ADH)	27
B.6.1	Zusammenstellung.....	27
B.6.2	Vorbereitung.....	27
B.7	Nachweis von β -Galactosidase.....	28
B.7.1	ONPG-Lösung.....	28
B.7.2	Pufferlösung.....	28
B.7.3	Vollständiges Reagenz	28
B.8	Salzmedium für den Nachweis von Indol.....	28
B.8.1	Tryptophan-Salzmedium.....	28
B.8.2	Kovacs-Reagenz	29
B.9	Alkalisches Peptonwasser.....	29
B.9.1	Zusammenstellung.....	29
B.9.2	Vorbereitung.....	29
B.10	Natriumchloridlösung	29
B.10.1	Zusammenstellung.....	29
B.10.2	Vorbereitung.....	29
B.11	TAE-Puffer	30
B.11.1	Zusammenstellung.....	30
B.11.2	Vorbereitung.....	30
Anhang C (Informativ) Konventionelle PCR für den Nachweis von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , direktem thermostabilem Hämolsin (<i>tdh</i>) und direktem thermostabilen verwandten Hämolsin (<i>tdh</i>), <i>Vibrio cholerae</i> und <i>Vibrio vulnificus</i>		31
C.1	Zusammenstellung des Mastermix	31
C.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> -Primere (konventionelle PCR)	31
C.3	Direkte thermostabile Hämolsin (<i>tdh</i>)- und direkte thermostabile verwandte Hämolsin (<i>tdh</i>)-Gene, <i>Vibrio parahaemolyticus</i> -Primere (konventionelle PCR).....	31
C.4	<i>Vibrio cholerae</i> -Primere (konventionelle PCR)	32
C.5	<i>Vibrio vulnificus</i> -Primere (konventionelle PCR).....	32
C.6	Wechselnde Parameter – <i>VptoxR</i> und <i>VVH</i>	32

C.7	Wechselnde Parameter – <i>prVC</i>	32
C.8	Wechselnde Parameter - <i>tdh</i> und <i>trh</i>	33
C.9	Kontrollmaterial – konventionelle PCR	33
C.10	Laborvergleichsuntersuchung.....	34
Anhang D (informativ) Real-time-PCR für den Nachweis von <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , direktem thermostabilem Hämolysin (<i>tdh</i>) und <i>Vibrio vulnificus</i>		36
D.1	Zusammenstellung des Mastermix	36
D.2	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> - Primere und Hydrolyse-Sonden	36
D.3	Thermostabiles direktes Hämolysin (<i>tdh</i>)-Gen <i>Vibrio parahaemolyticus</i> - Primere und Hydrolyse-Sonden	36
D.4	<i>Vibrio vulnificus</i> - Primere und Hydrolyse-Sonden	37
D.5	Wechselnde Parameter	37
D.6	Kontrollmaterial – Real-time-PCR.....	37
Anhang E (informativ) Ergebnisse einer Laborvergleichsuntersuchung.....		38
Literaturhinweise.....		42

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 21872:2016) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalyse — Horizontale Verfahren“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 21872:2016 wurde vom CEN als prEN ISO 21872:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der WTO-Grundsätze zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: Foreword - Supplementary information.

Diese erste Ausgabe ersetzt die Technischen Spezifikationen ISO/TS 21872-1:2007 und ISO/TS 21872-2:2007, die technisch überarbeitet wurden.

Hauptänderungen

- gleiches Verfahren zum Nachweis von lebensmittelbedingten *Vibrio* spp.
- Leistungsmerkmale des Verfahrens wurden Anhang E hinzugefügt.

Einleitung

Aufgrund der großen Vielfalt an Nahrungs- und Futtermitteln wird dieses horizontale Verfahren nicht immer im Detail für bestimmte Produkte geeignet sein. In diesem Fall dürfen für diese Produkte speziell geeignete Verfahren angewendet werden, falls es absolut notwendig sein sollte, möglichst dieses horizontale Verfahren anzuwenden. Dennoch wird jeglicher Versuch unternommen, dieses horizontale Verfahren so weit wie möglich anzuwenden.

Wenn diese Internationale Norm demnächst überprüft wird, werden alle Informationen, die zur Verfügung stehen, betrachtet, in welchem Umfang dieses horizontale Verfahren durchgeführt wurde und welche Gründe für Abweichungen in diesem Verfahren im Fall von bestimmten Produkten es gibt.

Die Harmonisierung der Prüfverfahren kann nicht unmittelbar geschehen und für bestimmte Produktgruppen können bereits Internationale Normen und/oder Nationale Normen existieren, die nicht dieses horizontale Verfahren erfüllen. Es ist zu hoffen, dass diese bei Prüfung solcher Normen verändert werden, um die Internationale Norm zu erfüllen, sodass die einzig verbleibenden Auszüge des horizontalen Verfahrens die für die bestens bekannten technischen Gründe notwendig sind.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein horizontales Verfahren zum Nachweis von enteropathogenen *Vibrio*-Arten fest, die Erkrankungen des Menschen am oder durch den Darmtrakt verursachen. Die durch das Verfahren nachweisbaren Arten umfassen *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus*.

Unter Berücksichtigung der Bemerkungen in der Einleitung, ist die Internationale Norm anwendbar auf:

- Produkte für die Ernährung des Menschen und Tierfutter;
- Umweltproben im Bereich der Nahrungsproduktion und der Lebensmittelverarbeitung.

ANMERKUNG 1 Gründe dafür, dass dieses Verfahren nicht angewendet wurde, werden in der Einleitung dargelegt.

ANMERKUNG 2 Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* als die lebensmittelbedingten enteropathogenen *Vibrio* spp. identifiziert, die Norm kann jedoch ebenso angemessen sein für die Identifizierung andere *Vibrio* spp., die eine Erkrankung des Menschen verursachen [1].

WARNUNG — Um die Gesundheit des Laborpersonals zu schützen, ist es wichtig, dass die Versuche zum Nachweis von *Vibrio*, insbesondere von toxigenetischen *V. cholerae* nur in ausgerüsteten Labors und unter der Aufsicht eines Mikrobiologen durchgeführt werden und dass die Entsorgung von kontaminierten Materialien mit großer Sorgfalt geschieht.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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).

ISO 6887, *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 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 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

3.1 Potentiell enteropathogene *Vibrio* spp.
Mikroorganismen, die typische Kolonien auf festen Selektivmedien bilden und die beschriebenen biochemischen oder molekularen Merkmale besitzen, wenn die Prüfung gemäß dieser Internationalen Norm durchgeführt wird.

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Internationale Norm beschreibt die speziellen Verfahren für *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus*

3.2

Nachweis von potentiell enteropathogenem *Vibrio* spp.

Bestimmung des Vorhandenseins und des Fehlens von enteropathogenen *Vibrio* spp. (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus*) (3.1), in einer bestimmten Produktmenge, wenn die Prüfung in Übereinstimmung mit dieser Internationalen Norm durchgeführt wird

4 Grundsatz

4.1 Allgemeines

Der Nachweis von potentiell enteropathogenen *Vibrio* spp. (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus*) erfordert vier aufeinanderfolgende Phasen (siehe auch Anhang A).

Wiederherstellung bestimmter *Vibrio* spp. aus Lebensmitteln kann durch die Verwendung verschiedener Inkubationstemperaturen verbessert werden, abhängig von den Ziel-Spezies oder dem Zustand der Lebensmittelmatrix. Zum Beispiel wird die Wiederherstellung von *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* in frischen Produkten durch Anreicherung bei 41,5 °C verbessert, wohingegen die Wiederherstellung von *V. vulnificus*, und von *V. parahaemolyticus* und *V. cholerae* in tiefgefrorenen, getrockneten oder gesalzenen Produkten durch Anreicherung bei 37 °C verbessert wird. Das Verfahren kombiniert Cholera- und spezielle halophile Kultivierungsverfahren zur Verwendung bei Vorhandensein von Mischungen aus *Vibrio*-Arten. Anwender dieser Internationalen Norm, die *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* nachweisen müssen, sollten alle spezifizierten Inkubationstemperaturen verwenden. Anwender dieser Internationalen Norm, die nicht *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* nachweisen müssen, dürfen die (das) spezielle(n) Verfahren je nach Spezies wählen. Solch eine Auswahl sollte klar im Prüfbericht angegeben werden.

ANMERKUNG *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* können in kleiner Anzahl in Begleitung von einer größeren Menge anderer Mikroorganismen aus der Familie der *Vibrionaceae* oder anderen vorhanden sein. Folglich können zwei ausgewählte Anreicherungen notwendig sein, um die Zielorganismen nachzuweisen.

4.2 Primäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium

Beimpfung der Prüfmenge im primären Anreicherungsmedium (APW) (5.1) bei Umgebungstemperatur, gefolgt von einer Inkubation bei 41,5 °C ± 1 °C für 6 h ± 1 h und 37 °C ± 1 °C für 6 h ± 1 h.

Bei tiefgefrorenen, getrockneten oder gesalzenen Produkten muss die primäre Anreicherung bei 41,5 °C ungeachtet der Zielspezies ausgelassen werden.

Nur bei *V. vulnificus* muss die primäre Anreicherung bei 41,5 °C ausgelassen werden.

Nur bei *V. parahaemolyticus* und/oder *V. cholerae* kann die primäre Anreicherung in frischen Produkten bei 37 °C ausgelassen werden.

4.3 Sekundäre Anreicherung in einem flüssigen Selektivmedium

Beimpfung des zweiten Anreicherungsmediums (APW) mit den aus 4.2. erhaltenen Kulturen.

Inkubation des beimpften Anreicherungsmediums bei 41,5 °C ± 1 °C für 18 h ± 1 h und/oder 37 °C ± 1 °C für 18 h ± 1 h.

Nur bei *V. parahaemolyticus* und/oder *V. cholerae* kann die sekundäre Anreicherung bei 37 °C ausgelassen werden.

4.4 Isolierung und Identifizierung

Beimpfung durch Kulturen, die aus 4.2 und 4.3 hervorgegangen sind, von zwei festen Selektivmedien:

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

Inkubation des TCBS-Mediums bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, danach Untersuchung nach 24 h 3 h. Inkubation des zweiten Selektivmediums erfolgt gemäß Herstellerempfehlung.

4.5 Bescheinigung

Die aus 4.4 isolierten mutmaßlichen Kolonien von *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* und *V. vulnificus* werden subkultiviert und durch Mittel von geeignetem biochemischen und/oder Polymerase-Kettenreaktionsprüfungen (PCR) bescheinigt.

Anwender dieser Internationalen Norm dürfen die biochemische und/oder PCR-Bescheinigung von Isolaten verwenden. Ein Nachweis von enteropathogenen *V. parahaemolyticus*, bei Vorhandensein von Genen des direkten thermostabilen Hämolytins (*tdh*) und/oder des direkten thermostabilen verwandten Hämolytins (*trh*) kann nur durch PCR-Prüfungen durchgeführt werden.

ANMERKUNG Eine PCR-basierte Identifizierung kann durch eine PCR für *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und *V. cholerae* oder durch eine Real-time-PCR für *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* erreicht werden. Die PCR-Verfahren für die Entwicklung dieser Norm sind in den Anhängen C und D angegeben.

5 Nährmedien und Reagenzien

Zur allgemeinen Arbeitspraxis siehe ISO 7218.

ANMERKUNG 1 Wegen der großen Anzahl der Nährmedien und Reagenzien hielt man es um der Klarheit des Textes willen besser, ihre Zusammenstellung und Vorbereitung in Anhang E anzugeben.

ANMERKUNG 2 Die Betriebsbedingungen für Primer, Sonden und PCR für die Entwicklung dieser Norm sind in den Anhängen C und D angegeben.

5.1 Anreicherungsmedium: alkalisches Peptonwasser (APW)

Siehe B.1.

5.2 Festes selektives Isolierungsmedium

5.2.1 Erstes Medium: Thiosulfat-, Citrat-, Galle- und Saccharose-Agar (TCBS-)-Medium

Siehe B.2.

Siehe ISO 11133.

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

Funktion	Inkubation	Kontrollstämme	WCDM ^a	Kriterien	Charakteristische Reaktionen
Produktivität	37 °C ± 1 °C für 18 – 24 h	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	00185 ^b	Gutes Wachstum	Grün (Saccharose- negativ)
	37 °C ± 1 °C für 18 – 24 h	<i>Vibrio furnissii</i>	00186 ^b	Gutes Wachstum	Gelb (Saccharose- positiv)
Selektivität	37 °C ± 1 °C für 18 – 24 h	<i>Escherichia coli</i> ^{c, d}	00012, 00013 oder 00090	Gesamthemmung	-
^a Stammkatalog des World Data Centre for Microorganisms (WDCM) erhältlich unter http://refs.wdcm.org ^b Minimalstamm ^c Einige nationale Beschränkungen und Anweisungen können die Verwendung eines <i>E. coli</i>-Serotyps fordern. Weisen Sie auf die nationalen Anforderungen in Bezug auf die Auswahl von <i>E. coli</i>-Serotypen hin. ^d Frei gewählter Stamm; einer der Stämme wird als Minimalstamm verwendet.					

5.2.2 Zweites Medium

Die Auswahl des zweiten Mediums wird dem Prüflabor überlassen. Vorbereitung des Mediums sollte in den Anweisungen des Herstellers festgelegt sein.

5.3 Kochsalz-Agar (SNA)

Siehe B.3.

5.4 Reagenz für den Nachweis von Oxidase

Siehe B.4.

5.5 Biochemische Prüfungen

5.5.1 Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (LDC)

Siehe B.5.

5.5.2 Arginin-Dihydrolase-Salzmedium (ADH)

Siehe B.6.

5.5.3 Reagenz für den Nachweis von β -Galactosidase

Siehe B.7.

5.5.4 Salzmedium zum Nachweis von Indol

Siehe B.8.

5.5.5 Alkalisches Peptonwasser

Siehe B.9.

5.5.6 Natriumchloridlösung

Siehe B.10.

5.6 PCR

5.6.1 TAE-Puffer (oder ein Puffer mit ähnlicher Leistung)

Siehe B.11.

5.6.2 Mastermix

Reagenzien müssen in Mengen hinzugefügt werden, gemäß Anweisungen des Herstellers. Siehe Anhänge C und D (informativ) z. B. Details des PCR-Mastermix, die in der Entwicklung dieser Norm verwendet wurde.

5.6.3 Primer und Sonden

Primer (und Hydrolyse-Sonde)-Sequenzen, falls benötigt, müssen in einer renommierten Fachzeitschrift veröffentlicht werden und für die Verwendung gegen ein breites Spektrum an Ziel-*Vibrio* und nicht zur Zielgruppe gehörenden Stämmen überprüft werden.

Bei *V. parahaemolyticus* sollte das Zielgebiet *toxR* sein.

Der Nachweis von pathogenen Stämmen von *V. parahaemolyticus* Genen sollte auf das direkte thermostabile Hämolysin (TDH) und direkte thermostabile verwandte Hämolysin (TRH) abgezielt werden.

Bei *V. cholerae* sollte das Zielgebiet für die PCR die 16S-23S rRNA der intergenischen Spacer-Regionen *prVC* sein.

Bei *V. vulnificus* sollte das Zielgebiet die Zytotoxin-Hämolysin-Region sein.

Zielgebiete außer den oben spezifizierten für die Identifizierung von *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und *V. cholerae* können verwendet werden, falls gezeigt wurde, dass sie gleichwertige Leistung besitzen, in einer renommierten Fachzeitschrift veröffentlicht wurden und für die Verwendung gegen ein breites Spektrum an Ziel-*Vibrio* und nicht zur Zielgruppe gehörenden Stämmen überprüft wurden.

Siehe Anhänge C (informativ) z.B. Details der Primer für die konventionelle PCR und Anhang D (informativ) für Primer und Hydrolyse-Sonden für Real-time-PCR für die Entwicklung dieser Norm.

5.6.4 Positives Kontrollmaterial

Für jedes Ziel-*Vibrio* spp. muss separates Kontrollmaterial verwendet werden. Siehe Anhänge C und D (informativ) z. B. Details der Kontrollstränge, die für die Entwicklung dieser Norm verwendet wurde.

5.6.5 Negative Extraktionskontrolle

Nuklease-freies Wasser oder sterile 0,85 %ige Kochsalzlösung, extrahiert nach 9.5.6.

6 Geräte und Glaswaren

Einweggeräte sind genauso wie wiederverwendbare Glaswaren akzeptabel, falls die technischen Bedingungen ähnlich sind.

Gewöhnliche mikrobiologische Laborausstattung (ISO 7218), und insbesondere das Folgende:

6.1 Kühlschrank, einstellbar auf $5\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$.

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

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

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

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

6.6 Mikrozentrifuge, für Reaktionsröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml und 2,0 ml und einer Laufleistung bei 10 000 x g.

6.7 Heizblock, geeignet für den Betrieb bei $95\text{ °C} \pm 2,0\text{ °C}$ o. ä.

6.8 Vortexmischer

6.9 Messpipetten und Pipettenfilterspitzen, für Volumen zwischen 1 und 1000 µl.

6.10 Verbrauchsgüter für die konventionelle oder Real-time-PCR, z. B. optische Platten und Kapseln, optische Plattenhalter, geeignet für die Verwendung mit der ausgewählten PCR-Maschine.

6.11 Konventionelle oder Real-time-PCR-Maschine, Geräte für die Gel-Elektrophorese und UV-Visualisierung, wie jeweils anwendbar.

7 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Labor eine tatsächlich repräsentative Probe erhält, die während Transport und Lagerung weder beschädigt noch verändert wurde.

Die Probenahme ist kein Bestandteil, die in dieser Internationalen Norm spezifiziert ist. Siehe Internationale Norm speziell zum entsprechenden Produkt. Falls eine spezielle Internationale Norm nicht existiert, wird das gegenseitige Einverständnis der entsprechenden Parteien zu diesem Thema empfohlen.

8 Probenvorbereitung

Bereiten Sie die Probe in Übereinstimmung mit ISO 6887 und/oder der Internationalen Norm im Hinblick auf das zu untersuchende Produkt vor. Falls eine spezielle Internationale Norm nicht existiert, wird das gegenseitige Einverständnis der entsprechenden Parteien zu diesem Thema empfohlen.

9 Verfahrensanweisung

(Siehe Bild A.1 im Anhang A).

9.1 Untersuchungsprobe und Erstverdünnung

ISO 21872 wurde für Untersuchungsproben bis 25 g bestätigt. Eine kleinere Untersuchungsprobe darf ohne zusätzliche Validierung/Bestätigung verwendet werden, vorausgesetzt, dass das gleiche Verhältnis von (Vor-)Anreicherungsbouillon zu Untersuchungsprobe bestehen bleibt. Eine größere Untersuchungsprobe als die ursprünglich überprüfte darf verwendet werden, falls eine Validations-/Bestätigungsstudie gezeigt hat, dass es keine negativen Auswirkungen auf den Nachweis von *Vibrio* spp. gibt.

ANMERKUNG 1 Eine Validierung kann gemäß den entsprechenden Teilen von ISO 16140 durchgeführt werden. Eine Validierung für Sammelproben kann gemäß des in ISO 6887-1, Anhang D, beschriebenen Protokoll durchgeführt werden.

Für die Vorbereitung der Erstverdünnung verwendet man das erste Anreicherungsmedium (APW), wie in 5.1 angegeben.

Untersuchungsproben (25 g oder 25 ml) werden in 225 ml eines Anreicherungsmediums homogenisiert.

Im Fall von großen Mengen (größer als 25 g oder 25 ml), sollte das APW auf $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und/oder $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (4.2) erwärmt werden, bevor eine Beimpfung mit der Untersuchungsprobe durchgeführt wird.

Falls die Verdünnung und die Inkubation nicht am gleichen Tag ausgeführt werden können, muss die Erstverdünnung bis zum nächsten Tag bei einer Temperatur von $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ aufbewahrt werden.

Um das Arbeitsvolumen der Untersuchung zu verringern, bei denen es Untersuchungsproben von mehr als 25 g von einem bestimmten Lebensmittelposten gibt, die untersucht werden müssen, und bei denen ein Nachweis vorhanden ist, dass eine Mischung (Sammlung der Untersuchungsproben) nicht die Ergebnisse insbesondere im Hinblick auf das Produkt verändert, dürfen die Untersuchungsproben vermischt werden. Zum Beispiel ist es möglich, falls 10 Untersuchungsproben von 25 g genommen werden, diese 10 Einheiten zu kombinieren, um eine Durchschnittsprobe von 250 g mit zusätzlich 2,25 l eines Anreicherungsmediums zu erhalten.

Die Zellenzahlen von *Vibrio* spp. verringern sich potentiell signifikant bei Lagerung bei Kühltemperaturen. Die Lagerung von Proben und Suspensionen bis zu einer geringeren Menge bei solchen Temperaturen sollte möglichst vermieden werden und ansonsten auf ein Minimum begrenzt sein.

9.2 Primäre selektive Anreicherung

Inkubation der Erstverdünnung (9.1) bei $41,5\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und/oder $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für $6\text{ h} \pm 1\text{ h}$ gemäß Tabelle 2.

Tabelle 2 — Primäre Inkubation und Zielspezies/Produktzustand

Ziel <i>Vibrio</i> spp. in <u>frischem</u> Produkt			
Inkubationstemperatur^a (6 h ± 1 h)	<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
41,5 °C ± 1 °C	✓	✓	x
37 °C ± 1 °C	x	x	✓
Ziel <i>Vibrio</i> spp. in <u>gefrorenem, getrocknetem oder gesalzenem</u> Produkt (wie z.B. Bacalhau, Stockfisch, Boknafisk, Katsuobushi, Obambo)			
Inkubationstemperatur^a (6 h ± 1 h)	<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
41,5 °C ± 1 °C	x	x	x
37 °C ± 1 °C	✓	✓	✓
^a <i>Vibrio</i> spp. mit Ausnahme von den aufgelisteten in 1 können bei diesen Inkubationstemperaturen wiederhergestellt werden.			

Hierbei sollte sorgfältig umgegangen werden, um das gesamte Verfahren an Produkten mit einem hohen Salzgehalt anzuwenden, da die Endkonzentration im Medium die Merkmale verändert.

ANMERKUNG 1 Kulturen, die in 9.2 gewonnen wurden, können durch die PCR für ein präsumptives Vorhandensein von *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und/oder *V. cholerae* vorausgewählt werden (Anhänge C und/oder D informativ).

ANMERKUNG 2 Studien haben gezeigt, dass das Nichtvorhandensein einer Verstärkung von *Vp-toxR* in APW-Bouillons nach 6 und 18 Stunden durch PCR unter Verwendung der Vorgehensweise, die in den Anhängen C [2] D und E beschrieben sind, berücksichtigt werden kann, um anzuzeigen, dass *V. parahaemolyticus* nicht nachzuweisen sind. Um die Menge der nachgeschalteten Prüfung zu verringern, bei denen eine Verstärkung von *Vp-toxR* in APW-Bouillons nach 6 und 18 Stunden nicht vorhanden ist, und wobei sich durch gezielte kontrollierte Studien gezeigt hat, dass die Matrix nicht die Ergebnisse verändert, darf das Anwenderlabor die Analyse für *V. parahaemolyticus* auf dieser Stufe beenden und berichten, dass *V. parahaemolyticus* als nicht nachweisbar in x g oder x ml ist. Diese Anmerkung gilt nicht für andere molekulare Ziele von *Vibrio* spp.

9.3 Sekundäre selektive Anreicherung

Beim Transfer von 1 ml von der Oberfläche der Kultur, die aus 9.2 gewonnen wurde, in ein Röhrchen mit 10 ml APW (5.1.) wird empfohlen, dass die Probe nicht vermischt wird, bevor die Teilprobe entnommen wird.

Inkubation der APW gemäß Tabelle 3.

Tabelle 3 — Sekundäre Inkubation und Zielspezies/Produkt

Ziel <i>Vibrio</i> spp. in <u>allen</u> Produktzuständen			
Inkubationstemperatur^a (18 h ± 1 h)	<i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
41,5 °C ± 1 °C	✓	✓	x
37 °C ± 1 °C	x	x	✓
^a <i>Vibrio</i> spp. mit Ausnahme von den aufgelisteten in 1 können bei diesen Inkubationstemperaturen wiederhergestellt werden.			

ANMERKUNG 1 Kulturen, die aus 9.3 hervorgegangen sind, dürfen durch die PCR vorausgewählt werden (Anhänge C und D informativ).

ANMERKUNG 2 Studien haben gezeigt, dass das Nichtvorhandensein einer Verstärkung von *Vp-toxR* in APW-Bouillons nach 6 und 18 Stunden durch PCR unter Verwendung der Vorgehensweise, die in den Anhängen C [2] D und E beschrieben sind, berücksichtigt werden kann, um anzuzeigen, dass *V. parahaemolyticus* nicht nachzuweisen sind. Um die Menge der nachgeschalteten Prüfung zu verringern, bei denen eine Verstärkung von *Vp-toxR* in ASPW-Bouillons nach 6 und 18 Stunden nicht vorhanden ist, und wobei sich erwiesen hat, dass die Matrix nicht die Ergebnisse verändert, kann das Anwenderlabor die Analyse für *V. parahaemolyticus* auf dieser Stufe beenden und berichten, dass *V. parahaemolyticus* als nicht nachweisbar in x g oder x ml ist. Diese Anmerkung gilt nicht für andere molekulare Ziele von *Vibrio* spp.

9.4 Isolierung und Identifizierung

Die Kulturen, die aus dem APW (9.2 und 9.3) gewonnen wurden, werden mit einer Probe von 1 µl auf TCBS-Agar (5.2.1) ausplattiert, sodass es eine Entwicklung von gut isolierten Kolonien erlaubt.

Es ist in der gleichen Weise mit dem ausgewählten zweiten selektiven Isolierungsmedium (5.2.2) mit einer frischen Probe vorzugehen.

Die Agarplatten umdrehen:

- TCBS-Agarplatten erfolgt die Inkubation bei 37 °C ± 1 °C für 24 h ± 3 h.
- Die Inkubation des zweiten Isolierungsmediums erfolgt gemäß den Anweisungen des Herstellers.

Nach der Inkubation erfolgt die Untersuchung des TCBS-Mediums und des zweiten selektiven Isolierungsmediums zum Nachweis von typischen Kolonien von präsumptiven pathogener *Vibrio* spp. Ihre Position wird auf der Unterseite der Platte gekennzeichnet.

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

- typische Kolonien von *V. parahaemolyticus* und *V. vulnificus* sind glatt, grün (negative Saccharose) und mit einem Durchmesser von 2 – 3 mm;
- typische Kolonien von *V. cholerae* sind glatt, gelb (positive Saccharose) mit einem Durchmesser von 1 – 2 mm

Beim zweiten Isolierungsmedium weist man die Kolonien nach, die gemäß ihren Merkmalen als mögliche Isolate von *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und/oder *V. cholerae* in Frage kommen.

ANMERKUNG 1 *Vibrio* spp. mit Ausnahme von den aufgelisteten in 1 können auf TCBS und dem zweiten Isolierungsmedium wiedergefunden werden.

ANMERKUNG 2 Bei einer erweiterten Wiederfindung von *V. vulnificus*, die Derivate von Cellobiose-Polymyxin enthalten, haben sich B-Colistin und Cellobiose-Colistin wirkungsvoll gezeigt [3].

9.5 Bescheinigung

9.5.1 Allgemeines

Unter Verwendung der Internationalen Norm können *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* und *V. cholerae* durch molekulare (Polymerase-Kettenreaktion(PCR)) und/oder biochemische Vorgehensweisen bescheinigt werden. Die Bestätigung darf im Endbenutzer-Labor oder durch ein Referenzfachlabor durchgeführt werden. Andere *Vibrio*-Spezies dürfen unter Verwendung dieser Norm isoliert werden.

Nicht alle *V. parahaemolyticus* enthalten pathogene Merkmale. Um ein pathogenes Merkmal der Stämme zu bescheinigen, sollte man vorzugsweise das Vorhandensein von thermostabilem direktem Hämolsin (TDH) oder direkten thermostabilen verwandten Hämolsin-Genen nachweisen. Dies sollte unter Verwendung von PCR-Prüfungen durchgeführt werden. Bestätigung auf PCR-Basis kann auch die subjektive Interpretation der biochemischen Identifizierungsprüfungen verringern und den Identifizierungsprozess beschleunigen.

Wenn sich dieser als verlässlich zeigt, dürfen kommerziell erhältliche biochemische Testkits verwendet werden, um *Vibrio* auf den zur Verfügung stehenden Speziesstufen zu bestimmen, indem sie mit einer Bakterienlösung beimpft werden, um in einem ausreichenden Salzmedium oder in einer Verdünnungsflüssigkeit nachgewiesen zu werden, und solange die Datenbank oder Identifikationstabelle für das Produkt auf den Reaktionen basiert, die durch Verwendung von ähnlichen Medien wie in dieser Norm beschrieben. Diese Testkits müssen in Übereinstimmung mit den Anweisungen des Herstellers verwendet werden.

Wenn sich diese als verlässlich erweisen, dürfen kommerziell erhältliche Molekularnachweis-Kits verwendet werden, um *Vibrio* auf eine Speziesstufe zu bestimmen. Diese Testkits müssen in Übereinstimmung mit den Anweisungen des Herstellers verwendet werden.

ANMERKUNG Eine Erkennung von Kolonien von *Vibrio* spp. ist in hohem Maße eine Frage der Erfahrung und ihre Erscheinung kann manchmal nicht nur von einer Spezies zur anderen unterschiedlich sein, sondern von einem Kultivierungsmedium zu einem anderen.

9.5.2 Auswahl der Kolonien zur Bestätigung und Vorbereitung von Reinkulturen

Zur Bestätigung wird eine Subkultur aus jedem selektiven Medium (9.4), mindestens eine Kolonie, als typisch oder dem potentiell pathogenen *Vibrio* spp. ähnelnd gesucht.

In Proben, in denen es als wichtig erachtet wird, den Nachweis von potentiell pathogenen *V. parahaemolyticus*, basierend auf dem Vorhandensein von direktem thermostabilem und direktem thermostabilen verwandten Hämolsin, zu optimieren, wird empfohlen, dass mindestens fünf, und falls möglich alle Kolonien, die typische *V. parahaemolyticus* aufweisen, Koloniemorphologien für eine nachgeschaltete Prüfung subkultiviert werden.

Beimpfung der ausgewählten Kolonien auf Platten von Kochsalz-Agar oder Schrägen von Kochsalz-Agar (5.3), um isolierte Kolonien zu gewinnen. Beimpfung bei 37 °C ± 1 °C für 24 h ± 3 h.

ANMERKUNG 1 Lebensmittel, insbesondere Meeresfrüchte, können große Mengen an Bakterien enthalten, einschließlich nicht-pathogene *Vibrio* spp., die durch den selektiven Kultivierungsprozess wachsen. Die Subkultivierung einer kleinen Menge an Kolonien kann dazu führen, dass potentiell pathogene Spezies verloren gehen. Dies ist besonders kritisch bei der Verwendung von TCBS, wobei Kolonien von Nicht-*Vibrio*-Spezies oder nicht-enteropathogenen *Vibrio* spp. den enteropathogenen Spezies ähneln.

ANMERKUNG 2 Der Anteil der pathogenen Stämme in Umwelt- und Lebensmittelproben ist normalerweise niedrig (bei *V. parahaemolyticus* machen sie weniger als 5 % des Gesamtanteil der *V. parahaemolyticus* in einer Probe aus), folglich ist die Wahrscheinlichkeit des Nachweises von pathogenen Stämmen durch Subkultivierung einer kleinen Menge von Kolonien zur Identifizierung und Bescheinigung sehr niedrig. Die Bescheinigung aller Kolonien ist daher informativ und nicht obligatorisch.

9.5.3 Prüfungen zur präsumptiven Identifizierung

9.5.3.1 Oxidase-Prüfung

Bei Verwendung einer Probenschleife, eines glatten Platin-Iridium-Drahts oder eines Glasstabs, wird eine Probe der Reinkultur aus dem Kochsalz-Agar (9.5.2) entnommen und auf das mit einem Oxidase-Reagenz befeuchtete Filterpapier gestreift (5.4) oder es wird ein kommerziell erhältlicher Test verwendet, gemäß den Anweisungen des Herstellers. Weder Probenschleifen aus Nickel-Chrom noch aus einem Metalledraht dürfen verwendet werden. Der Test ist positiv, wenn sich die Farbe innerhalb von 10 s in hellviolett, violett oder tiefes purpurrot verändert.

Weder Probenschleifen aus Nickel oder Chrom können zu verfälschten positiven Ergebnissen führen und sollten vermieden werden.

9.5.3.2 Mikroskopische Untersuchung (optional)

Bei jeder Reinkultur, die aus 9.4 gewonnen wurde, geht man gemäß a) und b) wie folgt vor:

- a) Ein Film für Gram-Färbung wird vorbereitet, siehe ISO 7218. Nach der Färbung untersucht man auf Morphologie und Gram-Reaktion bei Verwendung eines Mikroskops und zeichnet die Ergebnisse auf:
- b) Beimpfung eines Röhrchens mit APW (5.1). Inkubation bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für 1 h bis 6 h. Ein Tropfen der Kultur wird auf eine saubere Scheibe gesetzt, mit einem Deckglas abgedeckt und auf Beweglichkeit unter dem Mikroskop untersucht. Man sollte die Kulturen beachten, die ein positives Ergebnis in Bezug auf Beweglichkeit aufzeigen.

9.5.3.3 Auswahl der Kulturen

Zur Bestätigung werden die Oxidase-positiven Kolonien behalten.

Zur Bestätigung werden ebenso die Gram-negativen Kolonien behalten, die ein positives Ergebnis im Beweglichkeitstest aufweisen (falls dies untersucht wurde).

9.5.4 Biochemische Bestätigung

9.5.4.1 Allgemeines

Bei Verwendung einer Impfschleife, werden die Medien, die in 9.5.4.2 bis 9.5.4.6 angegeben sind, mit jeder Kultur beimpft, die aus den Kolonien von 9.5.2 gewonnen wurden.

9.5.4.2 L-Lysin-Decarboxylase-Salzmedium (5.5.1)

Das flüssige Medium wird knapp unter der Oberfläche beimpft. 1 ml steriles Mineralöl wird der Oberseite des Mediums hinzugefügt.

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

Trübung und eine violette Färbung nach der Beimpfung kennzeichnen eine positive Reaktion (bakterielles Wachstum und Decarboxylierung von Lysin). Eine Gelbfärbung kennzeichnet eine negative Reaktion.

9.5.4.3 Arginin-Dihydrolase-Salzmedium (5.5.2)

Das flüssige Medium wird knapp unter der Oberfläche beimpft. 1 ml steriles Mineralöl wird der Oberseite des Mediums hinzugefügt.

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

Trübung und eine violette Färbung nach der Beimpfung kennzeichnen eine positive Reaktion (bakterielles Wachstum und Dihydroxylierung von Arginin). Eine Gelbfärbung kennzeichnet eine negative Reaktion.

9.5.4.4 Nachweis von β -Galactosidase (5.5.3)

Ein Röhrchen mit 0,25 ml Kochsalzlösung wird mit der präsumptiven Kolonie (5.5.6) beimpft.

1 Tropfen Toluol wird hinzugefügt und das Röhrchen geschüttelt.

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

0,25 ml des Reagenz wird für den Nachweis von β -Galactosidase hinzugefügt und anschließend gemischt.

Das Röhrchen wird in ein Wasserbad bei $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ gesetzt, dort $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ stehengelassen, zeitweise untersuchen.

Eine Gelbfärbung kennzeichnet eine positive Reaktion (Vorhandensein von β -Galactosidase). Die Reaktion ist oft sichtbar nach 20 min. Ein Fehlen einer Färbung nach 24 h kennzeichnet eine negative Reaktion.

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

9.5.4.5 Nachweis von Indol (5.5.4)

Beimpfung eines Röhrchens mit der präsumptiven Kolonie, das 5 ml des Trypton-Tryptophan-Salzmedium enthält.

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

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

9.5.4.6 Halotoleranz-Test (5.5.5)

Eine Reihe von Peptonwasser mit zunehmender Salzkonzentration (NaCl) wird hergestellt: 0,6 % und 10 % (5.5.5).

Beimpfung jedes Röhrchens (5.5.5) mit der präsumptiven Kolonie.

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

Beobachtung einer Trübung zeigt an, dass das Bakterium bei der vorhandenen Konzentration von Natriumchlorid im Röhrchen des alkalischen Peptonwassers wachsen kann.

9.5.4.7 Interpretation der biochemischen Tests

V. parahaemolyticus, *V. cholerae* und *V. vulnificus* geben allgemein die Reaktionen an, die in Tabelle 4 aufgeführt werden.

Tabelle 4 — Interpretation der biochemischen Prüfungen

Prüfung	<i>Vibrio cholerae</i>^a	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>^a	<i>Vibrio vulnificus</i>^a	<i>Vibrio mimicus</i>^{a b}	<i>Vibrio fluvialis</i>^{a b}
Oxidase	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	–
ADH	–	–	–	–	+
ONPG-Hydrolyse	+	–	+	+	+
Produktion von Indol	+	+	+	+	V
Wachstum in Peptonwasser mit					
0 %iger Kochsalzlösung	+	–	–	+	–
6 % iger Kochsalzlösung	–	+	+	–	+
10 % iger Kochsalzlösung	–	–	–	–	–
^a Das +-Zeichen bezeichnet 76 – 89 % positive Reaktionen ^b Vorgesehen für Referenzzwecke V variable Ergebnisse					

ANMERKUNG Die Reaktionen aus Tabelle 4 sind eine Richtlinie zur Identifizierung der aufgelisteten Spezies. Zusätzliche phänotypische Tests können erforderlich sein, um diese Spezies vollständig von den anderen und von nicht-pathogenen *Vibrio* spp. zu unterscheiden.

Man sollte vorzugsweise die Serologie für *V. cholerae* durchführen (zumindest, um festzustellen, ob sie Serogruppen O1 oder O139 sind), was im Endbenutzer-Labor oder durch ein Referenzfachlabor durchgeführt werden darf.

In seltenen Fällen sind *V. parahaemolyticus* bei der ONPG-Hydrolyse positiv. Zusätzliche phänotypische und/oder molekulare Tests können erforderlich sein, um diese Spezies vollständig von den anderen und von nicht-pathogenen *Vibrio* spp. zu unterscheiden.

9.5.4.8 Schritt-für-Schritt-Bestätigung (optional)

V. cholerae und *V. parahaemolyticus* weisen einen unterschiedlichen Salzgehalt auf. Mit den ausgewählten Kulturen in 9.5.3.3 werden Wachstumstests in 10 %igem NaCl-Peptonwasser (5.5.5) und Arginin-Dihydrolase (5.5.2) durchgeführt. Mit weiteren Bestätigungstests in jeder Kolonie fortfahren, die kein Wachstum in 10 %igem NaCl-Peptonwasser und eine negative Arginin-Dihydrolase aufweist.

Vorzugsweise wird gleichzeitig auf Kochsalz-Agar subkultiviert, um sicherzustellen, dass das „Nichtwachsen“ in 10 %igem NaCl-Peptonwasser nicht an einer toten Kultur liegt.

9.5.5 PCR-Bestätigung

9.5.5.1 Allgemeines

Die Minimalanforderungen für die Verstärkung und den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen durch PCR sind in ISO 22118, ISO 22119 und ISO 22174 angelegt.

PCR kann durch konventionelle oder PCR-Formate in Real-time durchgeführt werden. Siehe 9.5.7 und Anhang C(informativ) z.B. Details der konventionellen PCR, siehe 9.5.8 und Anhang D (informativ) für Real-time-PCR, die für die Entwicklung dieser Norm verwendet wurden.

- Bei PCR werden Kolonien verwendet, die aus 9.5.3,3 gewonnen wurden.
- Bei einem Transport zu einem Spezialistenlabor erfolgt eine Beimpfung der Kolonien auf Platten von Kochsalz-Agar oder Schrägen von Kochsalz-Agar (5.3).

ANMERKUNG Unter bestimmten Umständen braucht die Prüfung für alle Ziele in einer einzigen Probe nicht notwendig zu sein.

9.5.6 DNA-Extraktion

Eine Bakteriensuspension mit einer Impfschleife vorbereiten, 1 bis 3 Kolonien aus dem Kochsalz-Agar nehmen (5.3) und in 500 µl steriler 0,85 %iger NaCl -(Kochsalz-) Lösung (5.5.6) oder Nuklease-freiem Wasser in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen beimpfen.

Die Mikrozentrifugenröhrchen in einem Heizblock (6.7) bei $95\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ für ca. 5 min. ± 1 min heizen.

Die Mikrozentrifugenröhrchen mit $10.000 \times g$ für 1 min zentrifugieren. Den Überstand für PCR-Tests aufbewahren.

Wenn sich diese als verlässlich erweisen, dürfen kommerziell erhältliche DNA-Extraktions-Kits verwendet werden, um bakterielle DNA zu extrahieren. Diese Testkits müssen in Übereinstimmung mit den Anweisungen des Herstellers verwendet werden.

Für jede geprüfte Probencharge muss eine Extraktionskontrolle enthalten sein. Eine DNA-Extraktion muss nebeneinander auf 500 µl Nuklease-freiem Wasser oder steriler 0,85 %iger NaCl-Lösung stattfinden.

Bei einer Langzeitlagerung wird eine Temperatur von $< -15\text{ °C}$ empfohlen. Proben, die kurz gelagert werden (< 1 Monat) können bei $< -4\text{ °C}$ tiefgekühlt werden.

9.5.7 Konventionelle PCR

Einen Mastermix unter Verwendung von geeigneten Primer vorbereiten, indem das Volumen angepasst wird, abhängig von der erforderlichen Anzahl der Reaktionen.

Eine Menge $x\text{ µl}$ einer extrahierten DNA einem eindeutig markierten Röhrchen zuordnen und eine Menge $y\text{ µl}$ des Mastermix hinzufügen.

Die PCR-Röhrchen in den Thermocycler stellen und die geeigneten Betriebsbedingungen anhängig vom verwendeten Primer-Set einstellen.

Die Betriebsbedingungen des Thermocyclers sollten als Einzelreaktionen ausgeführt werden und 20 bis 30 Zyklen laufen, je nach Ziel (siehe Anhang C (informativ)). Die Dauer und Temperatur jeder Stufe (Denaturierung, Annealing und Extension) wird von den verwendeten Reagenzien abhängig sein. Siehe Anhang C (informativ) für Details des PCR-Primer und Betriebsbedingungen, die für die Entwicklung dieser Norm verwendet wurden.

Ein 2 %iges Agarose-Gel durch Mischen von 2 g Agarose mit 100 ml 1X TAE-Puffer (oder einem gleichwertigen Puffer) vorbereiten (5.6.1). Abkühlen lassen, bevor einige Tropfen von Ethidiumbromid oder einem alternativen Farbstoff hinzugefügt wird, wobei eine Visualisierung des Produkts ermöglicht wird.

Einen ausreichend großen Gel-Kamm in die Gussform setzen, bevor das Gel eingegossen wird und es erkalten lassen, bevor der Kamm wieder entfernt wird.

Mit 10 µl einer 100 bp DNA-Leiter und die folgenden Kammern mit 20 µl PCR-Produkt beladen, das vorher vorbereitet wurde, indem der angemessene Ladefarbstoff nach Bedarf verwendet wird. Das Gel bei 130 Volt für 25 bis 30 min in Betrieb nehmen.

Nach der Elektrophorese, wird das Gel visualisiert, mit Hilfe von einem UV-Transilluminator, siehe Anhang C (informativ) für Details der zu erwartenden Produktgrößen für Primer, die für die Entwicklung dieser Norm verwendet wurden.

PCR-Produkte sollten durch ein geeignetes Verfahren nach Bedarf bestätigt werden.

PCR darf verwendet werden für eine Vorauswahl für das Vorhandensein des Zielbakteriums in primären (9.1) und sekundären Anreicherungsbouillons (9.2), nach Inkubation, was eine Downstream-Anvisierung der Identifizierung ermöglicht. Es wird empfohlen, dass für Proben, die wichtig sind z. B. offizielle Kontrollen, globale Seuchenausbrüche, Isolierung von Kolonien und die Bestätigung nach diesem Standard ausgeführt werden.

9.5.8 Real-time-PCR

20 µl des relevanten Mastermix zu jeder Kammer hinzufügen.

Für jede geprüfte Probencharge in einem Thermocycler wird eine optische Platte mit Folgendem vorbereitet:

- Mindestens 1 Kammer mit 5 µl einer verdünnten Proben-DNA;
- Mindestens 1 Kammer mit 5 µl einer negativen Extraktionskontrolle;
- Mindestens 1 Kammer mit 5 µl einer Kontroll-DNA für jede Ziel-Analyse;
- Mindestens 1 Kammer mit 5 µl von Nuklease-freiem Wasser

20 µl des relevanten Mastermix zu jeder Kammer hinzufügen.

Die Platte mindestens 45 Zyklen aussetzen. Die Dauer und Temperatur jeder Stufe (Denaturierung, Annealing und Extension) wird von den verwendeten Reagenzien abhängig sein; sie sollten auf den Empfehlungen des Herstellers beruhen.

Bei Real-time-PCR-Maschinen, bei denen der Anwender den Punkt der Fluoreszenz-Messung setzen kann, muss dies am Ende der Extensionsstufe gesetzt werden

Die Amplifikationsplots mit Hilfe der Vorgehensweise analysieren, die vom Hersteller der Real-time-PCR-Maschine empfohlen wird. Der Schwellenwert sollte idealerweise eingestellt sein, sodass er den Bereich durchläuft, in dem die Amplifikationsplots (logarithmische Darstellung) parallel sind (Exponentialphase).

Negativkontrollen (Nuklease-freies Wasser und negative Extraktionskontrollen) müssen immer negativ sein; falls positive Ergebnisse in diesen Kontrollen auftreten, müssen alle Proben, die positive Ergebnisse liefern, erneut geprüft werden.

Siehe Anhang D (informativ) für Beispiel-Details eines Amplifikationsverfahrens, das in der Entwicklung dieser Norm verwendet wurde.

ANMERKUNG Real-time-PCR kann verwendet werden für das Vorhandensein von *Vibrio* spp. in primären (9.1) und sekundären Anreicherungsbouillons (9.2), nach Inkubation, was eine Downstream-Anvisierung der Identifizierung ermöglicht. Es wird empfohlen, dass für Proben, die wichtig sind wie z. B. offizielle Kontrollen, globale Seuchenausbrüche, Isolierung von Kolonien und die Bestätigung ausgeführt werden gemäß diesem Standard.

10 Angabe der Ergebnisse

Abhängig von den Interpretationsergebnissen, wird angegeben, dass potentiell enteropathogene *Vibrio* spp. In einer Untersuchungsprobe nachgewiesen oder nicht nachgewiesen wurde, in einer Menge von x g oder x ml des Produkts (Siehe ISO 7218), indem die Bezeichnung der relevanten Spezies und alle Pathogenitätsmerkmale spezifiziert werden.

11 Leistungsmerkmale des Verfahrens

11.1 Ringversuch

Die Leistungseigenschaften des Verfahrens wurden in einem Ringversuch bestimmt, um die Spezifität, Sensibilität und, wenn möglich, LOD₅₀ dieses Verfahrens festzulegen. Die Daten wurden in Anhang E zusammengefasst. Die Werte, die von dem Ringversuch abweichen, sind möglicherweise nicht anwendbar auf andere als die im Anhang E angegebenen Lebensmittelsorten.

11.2 Prüfeempfindlichkeit

Die Sensibilität wird als die Anzahl der gefundenen positiven Proben definiert, geteilt durch die Anzahl der getesteten Proben bei einer vorgegebenen Kontaminationsstufe. Die Ergebnisse hängen folglich von der Kontaminationsstufe der Probe ab.

11.3 Spezifität

Die Spezifität wird als eine Anzahl von leeren Proben definiert, geteilt durch die Anzahl der gefundenen negativen Proben.

11.4 LOD₅₀

LOD₅₀ ist die Konzentration (cfu/Probe) bei einer 50 %igen Nachweiswahrscheinlichkeit.

12 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss angeben:

- Alle Informationen, die für die vollständige Identifizierung der Probe benötigt werden;
- das angewandte Probenahmeverfahren, falls bekannt;
- Jede Abweichung im Hinblick auf das Anreicherungsmedium oder der angewandten Inkubationsbedingungen;
- alle Einzelheiten des Verfahrens, die nicht in dieser Norm festgelegt oder als optional betrachtet werden, zusammen mit Details alle Vorkommnisse, die die Ergebnisse beeinflusst haben könnten;
- Die gewonnenen Ergebnisse und besonders, wenn die Pathogenität der isolierten Stämme bestätigt wurde.

Der Prüfbericht muss ebenso erwähnen, ob ein positives Ergebnis bei Verwendung von nur einem Isolierungsmedium vorliegt (5.2.2), was nicht in dieser Internationalen Norm angegeben ist.