

DIN EN ISO 22964

ICS 07.100.30; 67.100.01

Einsprüche bis 2015-05-06

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp.
(ISO/DIS 22964:2015);
Deutsche Fassung prEN ISO 22964:2015**

Microbiology of the food chain –
Horizontal method for the detection of *Cronobacter* spp. (ISO/DIS 22964:2015);
German version prEN ISO 22964:2015

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale pour la détection de *Cronobacter* spp. (ISO/DIS 22964:2015);
Version allemande prEN ISO 22964:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-03-06 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 28 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Der hiermit der Öffentlichkeit zur Stellungnahme vorgelegte Norm-Entwurf wurde von der Arbeitsgruppe 6 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ (Sekretariat: Frankreich) des Technischen Komitees CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: Deutschland) erarbeitet. Auf Grund der Zusammenarbeit mit dem ISO/TC 34/SC 9 „Microbiology“ (Sekretariat: Frankreich) im Rahmen der Wiener Vereinbarung ist dieser Norm-Entwurf auch als Internationaler Norm-Entwurf erschienen.

Die Mitarbeit des DIN in der Arbeitsgruppe 6 des CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ und im SC 9 des ISO/TC 34 „Food products“ wird über den Arbeitsausschuss NA 057-01-06 AA „Mikrobiologische Lebensmitteluntersuchung einschließlich Schnellverfahren“ des DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Es wird darauf hingewiesen, dass diese zweite Ausgabe von ISO 22964 die ISO/TS 22964:2006 ersetzt. In dieser überarbeiteten Ausgabe wurde der Anwendungsbereich auf Produkte, die für den menschlichen Verzehr oder als Futtermittel bestimmt sind und auf Umgebungsproben ausgeweitet. Die Anreicherungsbouillon (mLST) wurde durch CSB und der Isolierungsagar ESIA wurde durch CCI-Agar ersetzt. Mehrere Bestätigungsprüfungen wurden durch andere Prüfungen nach Tabelle 1 des vorliegenden Dokuments ersetzt.

Für die im Abschnitt 2 zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen 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

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 und Futtermitteln — Anleitungen für die Vorbereitung und Herstellung von Nährmedien — Teil 1: Allgemeine Anleitungen für die Qualitätssicherung bei der Zubereitung von Nährmedien im Laboratorium*

Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis von Cronobacter spp. (ISO/DIS 22964:2015)

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la détection de Cronobacter spp. (ISO/DIS 22964:2015)

Microbiology in the food chain — Horizontal method for the detection of Cronobacter spp. (ISO/DIS 22964:2015)

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.5a

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
4.1 Nicht selektive Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser (BPW)	5
4.2 Anreicherung in einem Differenzierungs- und Screeningmedium (<i>Cronobacter</i> -Screening-Bouillon, CBS)	5
4.3 Ausplattierung und Identifizierung auf chromogenem Agar [chromogenem <i>Cronobacter</i> -Isolierungsagar (CCI-Agar)]	6
4.4 Bestätigung	6
5 Nährmedien und Reagenzien	6
6 Geräte und Glasgeräte	6
7 Probenahme	7
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	7
9 Durchführung (siehe Diagramm in Anhang A)	7
9.1 Einwaage	7
9.2 Voranreicherung	7
9.3 Anreicherung.....	7
9.4 Isolierung von verdächtigen <i>Cronobacter</i> spp.	8
9.5 Bestätigung	8
9.6 Auswertung der biochemischen Ergebnisse.....	10
10 Angabe der Ergebnisse.....	10
11 Genauigkeit (Präzision) des Verfahrens.....	10
11.1 Ringversuch	10
11.2 Empfindlichkeit (Sensitivität)	10
11.3 Spezifität	10
11.4 LOD ₅₀	10
12 Untersuchungsbericht	10
Anhang A (normativ) Diagramm des Prüfverfahrens.....	11
Anhang B (normativ) Zusammensetzung, Herstellung und Leistungsprüfung von Nährmedien und Reagenzien	12
Anhang C (informativ) Unterscheidung von <i>Cronobacter</i> spp. von anderen Gattungen	21
Anhang D (informativ) Ergebnisse der Ringversuche	22
Literaturhinweise	26

Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 22964:2015) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird, in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ erarbeitet.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können, ohne dass diese vorstehend identifiziert wurden. CEN oder CENELEC sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Einleitung

Wegen der großen Vielfalt von Lebensmittel- und Futtermittelprodukten ist dieses horizontale Verfahren möglicherweise nicht bis ins Einzelne für bestimmte Produkte geeignet. In diesem Fall dürfen abweichende Verfahren, die für diese Produkte spezifisch sind, angewendet werden, wenn dies aus berechtigten fachlichen Gründen unbedingt erforderlich ist. Dennoch sollten alle Anstrengungen unternommen werden, dieses horizontale Verfahren so weit wie möglich anzuwenden.

Bei der nächsten Überarbeitung dieser Internationalen Norm werden sämtliche dann vorliegenden Informationen hinsichtlich des Umfangs, in dem dieses horizontale Verfahren befolgt wurde, und die Gründe für Abweichungen von diesem Verfahren bei bestimmten Produkten berücksichtigt werden.

Die Harmonisierung von Untersuchungsverfahren kann nicht sofort erfolgen, und für bestimmte Produktgruppen können bereits Internationale Normen und/oder nationale Normen vorliegen, die diesem horizontalen Verfahren nicht entsprechen. Es ist jedoch anzustreben, dass solche Normen bei einer Überarbeitung so geändert werden, dass sie dieser Internationalen Norm entsprechen, so dass es sich bei eventuell noch verbleibenden Abweichungen von diesem horizontalen Verfahren nur um solche handelt, die aus berechtigten technischen Gründen erforderlich sind.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein horizontales Verfahren zum Nachweis von *Cronobacter* spp. fest.

Vorbehaltlich der in der Einleitung erörterten Einschränkungen gilt diese Internationale Norm für

- Nahrungsmittelprodukte und Zutaten, die für den menschlichen Verzehr oder als Futtermittel bestimmt sind,
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und der Behandlung von Lebensmitteln.

ANMERKUNG Bestimmte neu vorgeschlagene oder neu klassifizierte *Cronobacter*-Spezies werden mit diesem Verfahren möglicherweise nicht nachgewiesen oder bestätigt (siehe Literaturhinweis [10]).

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente 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 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*

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

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

***Cronobacter* spp.**

Mikroorganismen, die auf chromogenem *Cronobacter*-Isolierungsagar (CCI-Agar) typische Kolonien bilden und die beschriebenen charakteristischen biochemischen Eigenschaften aufweisen, wenn die Prüfungen nach dieser Internationalen Norm durchgeführt werden

3.2

Nachweis von *Cronobacter* spp.

Bestimmung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins dieser Mikroorganismen in einer bestimmten Masse des Produkts, wenn die Prüfungen nach dieser Internationalen Norm durchgeführt werden

4 Kurzbeschreibung

4.1 Nicht selektive Voranreicherung in gepuffertem Peptonwasser (BPW)

Gepuffertes Peptonwasser (BPW) wird mit der Einwaage (Prüfmenge) beimpft, anschließend wird bei 34 °C bis 38 °C für (18 ± 2) h bebrütet.

4.2 Anreicherung in einem Differenzierungs- und Screeningmedium (*Cronobacter*-Screening-Bouillon, CBS)

Das selektive Anreicherungsmedium wird mit der in 4.1 erhaltenen Kultur beimpft und (24 ± 2) h bei $(41,5 \pm 1)$ °C bebrütet.

4.3 Ausplattierung und Identifizierung auf chromogenem Agar [chromogenem *Cronobacter*-Isolierungsagar (CCI-Agar)]

Der chromogene Agar wird mit der in 4.2 erhaltenen Anreicherungskultur beimpft und (24 ± 2) h bei $(41,5 \pm 1)$ °C bebrütet.

4.4 Bestätigung

Von dem chromogenen Agar werden typische Kolonien ausgewählt, auf einem nicht selektiven Agar, wie z. B. Trypton-Soja-Agar (TSA), gereinigt und biochemisch charakterisiert.

5 Nährmedien und Reagenzien

Zur üblichen Laborpraxis siehe ISO 7218, zur Herstellung und Prüfung von Medien siehe ISO 11133.

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

6 Geräte und Glasgeräte

6.1 Gerät für die Trockensterilisation (Heißluft-Sterilisator) oder Dampfsterilisation (Autoklav).

Siehe ISO 7218.

6.2 Brutschränke, einstellbar auf 34 °C bis 38 °C, (37 ± 1) °C und $(41,5 \pm 1)$ °C.

6.3 Impfnadeln und -ösen, aus Platin/Iridium oder Nickel/Chrom, mit einem Durchmesser von etwa 3 mm (einem Volumen von 10 µl), oder Kunststoffösen zum Einmalgebrauch und Glasstäbe.

6.4 pH-Messgerät, mit einer Fehlergrenze der Kalibrierung von $\pm 0,1$ pH-Einheit bei 25 °C.

6.5 Kolben und Flaschen, mit Verschlüssen, mit geeignetem Fassungsvermögen zur Herstellung und Lagerung von Anreicherungsbouillons und -agarmedien.

6.6 Messzylinder.

6.7 Röhrchen (mit Stopfen oder Schraubverschluss) oder Kulturflaschen, mit einem Nennvolumen von 30 ml und 10 ml, mit ungiftigen Metallverschlüssen mit Auskleidung oder Kunststoffverschlüssen zum Einmalgebrauch.

6.8 Petrischalen, mit einem Durchmesser von etwa 90 mm.

6.9 Spektralphotometer, mit dem die Absorption von Licht bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden kann.

6.10 Pistill und Mörser.

6.11 Kühlschränke, die bei (5 ± 3) °C und zwischen 0 °C und 5 °C betrieben werden können.

6.12 Wasserbäder, einstellbar auf eine Temperatur zwischen 47 °C und 50 °C und auf (37 ± 1) °C.

6.13 Trockenschrank (oder Wärmeschrank mit Belüftung durch Konvektion), einstellbar auf eine Temperatur zwischen 25 °C und 50 °C.

7 Probenahme

Die Probenahme wird in dieser Internationalen Norm nicht festgelegt. Liegt keine spezifische Internationale Norm vor, die sich mit der Probenahme des betreffenden Produktes befasst, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

Es ist wichtig, dass das Laboratorium eine Probe erhält, die wirklich repräsentativ ist und während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde (siehe ISO 7218).

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird nach dem entsprechenden Teil von ISO 6887 vorbereitet, der das betreffende Produkt behandelt.

Trifft ISO 6887 nicht zu, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

9 Durchführung (siehe Diagramm in Anhang A)

9.1 Einwaage

Zur Herstellung einer Erstverdünnung werden 10 g oder 10 ml der Untersuchungsprobe (Abschnitt 8) zu 90 ml Voranreicherungsmedium (B.1) gegeben, was dem in diesem Verfahren festgelegten Verhältnis von Untersuchungsprobe zu Anreicherungsmedium entspricht. Ein geringerer Umfang der Einwaage darf ohne Notwendigkeit einer zusätzlichen Validierung verwendet werden, ein größerer Umfang der Einwaage darf jedoch nur unter der Voraussetzung verwendet werden, dass in einer Validierungsstudie keine Auswirkungen auf die LOD nachgewiesen wurden.

Bei großen Mengen sollte das BPW vor dem Beimpfen mit der Einwaage auf 34 °C bis 38 °C vorgewärmt werden.

Trockene Proben werden (60 ± 10) min vor der Bebrütung bei Raumtemperatur ungestört stehen gelassen. Eine Einstellung des pH-Wertes ist nicht notwendig. Wenn die Trockenmilch nach 1 h noch nicht gelöst ist, wird der Inhalt des Kolbens durch Schütteln oder Rühren mit einem sterilen Spatel gemischt.

ANMERKUNG Das Bündeln (Poolen) von Einwaagen kann erfolgen, wenn dieses Verfahren nachweislich das Ergebnis für dieses konkrete Nahrungsmittel nicht beeinflusst, da große Probenmengen die Wiederfindung gestresster *Cronobacter* spp. beeinträchtigen können, wenn eine störende Mikroflora vorliegt (siehe Literaturhinweise [8] und [9]). Weitere Informationen zum Bündeln von Einwaagen sowie ein Verfahren zur Prüfung des Einflusses des Bündelns auf die Empfindlichkeit des Verfahrens sind in ISO 6887-1 enthalten.

9.2 Voranreicherung

Das nach 9.1 hergestellte beimpfte Voranreicherungsmedium wird (18 ± 2) h bei 34 °C bis 38 °C (6.2) bebrütet.

9.3 Anreicherung

Nach der Bebrütung des beimpften Anreicherungsmediums wird 0,1 ml der in 9.2 erhaltenen Kultur in 10 ml CSB (B.2) überführt. Die Bebrütung erfolgt für (24 ± 2) h bei (41,5 ± 1) °C (6.2).