

DIN EN ISO 6579-1

ICS 07.100.30

Entwurf

Einsprüche bis 2014-09-25
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 6579:2007-10 und
DIN EN ISO 6785:2007-09

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur
Serotypisierung von Salmonellen –
Teil 1: Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp.
(ISO/DIS 6579-1:2014);
Deutsche Fassung prEN ISO 6579-1:2014**

Microbiology of the food chain –
Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* –
Part 1: Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. (ISO/DIS 6579-1:2014);
German Version prEN ISO 6579-1:2014

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale pour la détection, le dénombrement et la sérotypie des *Salmonella* –
Partie 1: Méthode horizontale pour la détection des *Salmonella* spp. (ISO/DIS 6579-1:2014);
Version allemande prEN ISO 6579-1:2014

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2014-07-25 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 Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN, 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 59 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

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 „Mikrobiologie“ (Sekretariat: Frankreich) im Rahmen der Wiener Vereinbarung ist dieser Norm-Entwurf auch als Internationaler Norm-Entwurf erschienen.

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

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

ISO 707	siehe DIN EN ISO 707
ISO/TR 6579-3	siehe DIN CEN ISO/TR 6579-3
ISO 6887-1	siehe DIN EN ISO 6887-1
ISO 6887-2	siehe DIN EN ISO 6887-2
ISO 6887-3	siehe DIN EN ISO 6887-3
ISO 6887-4	siehe DIN EN ISO 6887-4
ISO 6887-5	siehe DIN EN ISO 6887-5
ISO 6887-6	siehe DIN EN ISO 6887-6
ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 11133	siehe DIN EN ISO 11133
ISO 13307	siehe DIN EN ISO 13307
ISO 17604	siehe DIN EN ISO 17604
ISO/TS 17728	siehe DIN CEN ISO/TS 17728
ISO 18593	siehe DIN ISO 18593

Änderungen:

Gegenüber DIN EN ISO 6579:2007-10 und DIN EN ISO 6785:2007-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die DIN EN ISO 6785:2007-09 „Milch und Milcherzeugnisse - Nachweis von *Salmonella* spp.“ wurde in diese Norm DIN EN ISO 6579-1 mit einbezogen;
- b) der Anwendungsbereich beinhaltet auch Proben aus der Primärproduktion;
- c) in einem Normativen Anhang wird der Nachweis von *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Paratyphi beschrieben;
- d) für die selektive Anreicherung besteht die Wahl zwischen der Verwendung der Bouillon oder des halbfesten Agars aus Rappaport-Vassiliadis-Medium (RVS oder MSRV);
- e) die Beimpfung des Isolierungsmediums wird weniger streng festgelegt. Das Ziel besteht im Erhalt gut voneinander abgesetzter einzelner Kolonien nach der Bebrütung;
- f) für die Bestätigung ist es zulässig, die Untersuchungen an nur einer verdächtigen Kolonie (anstelle an einer verdächtigen Kolonie von jeder Medienkombination) durchzuführen. Wenn diese Untersuchungen des Isolats in Bezug auf *Salmonella* negativ sind, müssen 4 weitere verdächtige Isolate aus verschiedenen Medienkombinationen untersucht werden;
- g) es ist erlaubt, die biochemische Bestätigung direkt an einer verdächtigen, gut von den anderen abgesetzten Kolonie von dem selektiven Ausplattierungsmedium durchzuführen. Die Überprüfung der Reinheit auf nicht selektivem Agarmedium kann anschließend parallel durchgeführt werden;
- h) zwei Bestätigungsuntersuchungen sind wahlfrei geworden (β -Galactosidase-Test und Indol-Reaktion), eine Bestätigungsuntersuchung wurde gestrichen (Voges-Proskauer-Reaktion);
- i) im vorliegenden Teil von ISO 6579 wird die serologische Bestätigung (bis zur Ebene der Serogruppe) beschrieben. Hinsichtlich eines Leitfadens zur Serotypisierung [bis zur Ebene des Serovars (Serotyps)] wird auf ISO 6579-3 verwiesen;
- j) Tabelle 1 (Beurteilung der biochemischen Untersuchungen) wurde verbessert;
- k) die Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien wurde zu Anhang B hinzugefügt;
- l) die Leistungsmerkmale von MSRV wurden zu Anhang C hinzugefügt;
- m) das gesamte Dokument wurde redaktionell überarbeitet.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 707, *Milch und Milcherzeugnisse — Leitfaden zur Probenahme*

DIN CEN ISO/TR 6579-3, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen — Teil 3: Leitfaden für die Serotypisierung von Salmonella spp.*

DIN EN ISO 6887-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen*

DIN EN ISO 6887-2, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 2: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Fleisch und Fleischerzeugnissen*

DIN EN ISO 6887-3, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 3: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Fisch und Fischerzeugnissen*

DIN EN ISO 6887-4, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 4: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von anderen Erzeugnissen als Milch und Milcherzeugnisse, Fleisch und Fleischerzeugnisse, Fisch und Fischerzeugnisse*

DIN EN ISO 6887-5, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 5: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Milch und Milcherzeugnissen*

DIN EN ISO 6887-6, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 6: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Proben aus der Primärproduktion*

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*

DIN EN ISO 13307, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Primärproduktion — Probenahmetechniken*

DIN EN ISO 17604, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Probenahme von Schlachtierkörpern zur mikrobiologischen Untersuchung*

DIN CEN ISO/TS 17728, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Probenahmetechniken für die mikrobiologische Untersuchung von Lebensmittel- und Futtermittelproben*

DIN ISO 18593, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen mittels Abklatschplatten und Tupfer*

Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen — Teil 1: Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonella spp. (ISO/DIS 6579-1:2014)

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et la sérotypie des Salmonella spp. — Partie 1 : Méthode horizontale pour la recherche des Salmonella spp. (ISO/DIS 6579-1:2014)

Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Horizontal method for the detection of Salmonella spp. (ISO/DIS 6579-1:2014)

ICS:

Deskriptoren:

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

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
Einleitung.....	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	7
4.1 Allgemeines	7
4.2 Voranreicherung in einem nicht selektiven, flüssigen Nährmedium	7
4.3 Anreicherung in/auf selektiven Nährmedien	8
4.4 Ausplattierung und Identifizierung	8
4.5 Bestätigung der Identität	8
5 Nährmedien, Chemikalien und Seren	8
5.1 Allgemeines	8
5.2 Nährmedien und Chemikalien	8
5.3 Antiseren	10
6 Geräte und Glasgeräte	10
7 Probenahme	11
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	11
9 Durchführung (siehe Fließschemata in Anhang A)	11
9.1 Einwaage und Erstverdünnung	11
9.2 Nicht selektive Voranreicherung	12
9.3 Selektive Anreicherung	13
9.4 Ausplattierung und Identifizierung	14
9.5 Bestätigung	15
10 Angabe der Ergebnisse.....	20
11 Genauigkeit (Präzision) des Verfahrens.....	20
11.1 Ringversuche	20
11.2 Empfindlichkeit	20
11.3 Spezifität	20
11.4 LOD ₅₀	20
12 Untersuchungsbericht	20
13 Qualitätssicherung	20
Anhang A (normativ) Fließschemata der Verfahren.....	22
A.1 Fließschema des Verfahrens zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln, Futtermitteln und Umgebungsproben aus dem Bereich der Lebensmittelherstellung.....	22
A.2 Fließschema des Verfahrens zum Nachweis von Salmonellen in Tierkot und in Umgebungsproben aus dem Bereich der Primärproduktion	23
Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung der Nährmedien und Chemikalien	24
B.1 Gepuffertes Peptonwasser	24

B.2	Rappaport-Vassiliadis-Medium mit Soja (RVS-Bouillon)	25
B.3	Modifiziertes halbfestes Medium nach Rappaport-Vassiliadis (MSRV) [12]	26
B.4	Muller-Kauffmann Tetrathionat-Novobiocin-Bouillon (MKTn) [14]	28
B.5	Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar) [14]	29
B.6	Nähragar (Beispiel für ein nicht selektives Nährmedium)	30
B.7	Dreizucker-Eisen-Agar (TSI-Agar)	31
B.8	Harnstoff-Agar (nach Christensen)	32
B.9	L-Lysin-Decarboxylase-Medium	33
B.10	β -Galactosidase-Reagenz (optional)	33
B.11	Medium und Reagenzien für die Indol-Reaktion (wahlfrei)	34
B.12	Kochsalzlösung	35
B.13	Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien	35
Anhang C (informativ) Ergebnisse von Ringversuchen		38
C.1	Leistungsmerkmale von RVS und MKTn	38
C.2	Leistungsmerkmale von MSRV zum Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. in Lebens- und Futtermitteln	41
C.3	Leistungsmerkmale von MSRV zum Nachweis von <i>Salmonella</i> spp. in Tierkot und in Umgebungsproben aus dem Bereich der Primärproduktion	42
Anhang D (normativ) Nachweis von <i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i> Serovare Typhi und Paratyphi		45
D.1	Einleitung	45
D.2	Nachweis von <i>Salmonella</i> Typhi und <i>S. Paratyphi</i>	45
D.3	Nährmedien	46
D.4	Geräte und Glasgeräte	49
D.5	Durchführung	49
D.6	Bestätigung	50
Anhang E (informativ) Angaben zu einigen selektiven Ausplattierungsmedien [20]		51

Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 6579-1:2014) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 6579-1:2014 wurde vom CEN als prEN ISO 6579-1:2014 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

ISO 6579 besteht unter dem allgemeinen Titel *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella* aus den folgenden Teilen:

- *Part 1: Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*
- *Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique [Technische Spezifikation]*
- *Part 3: Guidelines for serotyping of Salmonella spp. [Technischer Bericht]*

Diese fünfte Ausgabe annulliert und ersetzt die vierte Ausgabe (ISO 6579:2002), die technisch überarbeitet wurde. Sie annulliert und ersetzt auch ISO 6785:2007 [4] und Änderung 1 von ISO 6579 (2007) [2].

Die Anhänge A, B und D bilden einen normativen Teil dieser Internationalen Norm. Die Anhänge C und E dienen nur der Information.

Die wichtigsten Änderungen in dieser fünften Ausgabe sind:

- ISO 6785 wurde in diese Version von ISO 6579-1 aufgenommen;
- Proben aus der Primärproduktion wurden in den Anwendungsbereich aufgenommen;
- der Nachweis von *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Paratyphi wird in einem normativen Anhang beschrieben;
- für die selektive Anreicherung besteht die Wahl zwischen der Verwendung der Bouillon der des halbfesten Agars aus Rappaport-Vassiliadis-Medium (RVS oder MSRV);
- die Beimpfung des Isolierungsmediums wird weniger streng vorgeschrieben. Das Ziel besteht im Erhalt gut voneinander abgesetzter einzelner Kolonien nach der Bebrütung;
- für die Bestätigung ist es zulässig, die Untersuchungen an nur einer verdächtigen Kolonie (anstelle an einer verdächtigen Kolonie von jeder Medienkombination) durchzuführen. Wenn diese Untersuchungen des Isolats in Bezug auf *Salmonella* negativ sind, müssen 4 weitere verdächtige Isolate aus verschiedenen Medienkombinationen untersucht werden;
- es ist erlaubt, die biochemische Bestätigung direkt an einer verdächtigen, gut von den anderen abgesetzten Kolonie von dem selektiven Ausplattierungsmedium durchzuführen. Die Überprüfung der Reinheit auf nicht selektivem Agarmedium kann anschließend parallel durchgeführt werden;

- zwei Bestätigungsuntersuchungen sind wahlfrei geworden (β -Galactosidase-Test und Indol-Reaktion), eine Bestätigungsuntersuchung wurde gestrichen (Voges-Proskauer-Reaktion);
- im vorliegenden Teil von ISO 6579 wird die serologische Bestätigung (bis zur Ebene der Serogruppe) beschrieben. Hinsichtlich eines Leitfadens zur Serotypisierung (bis zur Ebene des Serovars (Serotyps)) wird auf Teil 3 von ISO 6579 verwiesen;
- Tabelle 1 (Beurteilung der biochemischen Untersuchungen) wurde verbessert;
- die Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien wurde zu Anhang B hinzugefügt;
- die Leistungsmerkmale von MSRV wurden zu Anhang C hinzugefügt.

Einleitung

Der vorliegende Teil von ISO 6579 beschreibt ein horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella* spp. in Lebensmitteln (einschließlich Milch und Milcherzeugnissen, ursprünglich in ISO 6785 beschrieben), Futtermitteln, Tierkot und in Umgebungsproben aus der Primärproduktion (die beiden letzteren wurden ursprünglich in Änderung 1 von ISO 6579:2002 beschrieben).

Mit diesem horizontalen Verfahren werden die meisten der *Salmonella*-Serovare nachgewiesen. Für den Nachweis einiger spezifischer Serovare sind möglicherweise zusätzliche Kultivierungsschritte notwendig. Für *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Paratyphi sind diese in einem getrennten Anhang beschrieben.

Ein Verfahren zur Zählung von *Salmonella* spp. ist in Teil 2 von ISO/TS 6579 [3] beschrieben.

Ein Leitfaden zur Serotypisierung von *Salmonella* spp. ist in Teil 3 von ISO/TR 6579 beschrieben.

WARNUNG — Um die Gesundheit des Laborpersonals sicherzustellen, ist es unerlässlich, dass Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen nur in ordnungsgemäß ausgestatteten Laboratorien unter Aufsicht eines erfahrenen Mikrobiologen vorgenommen werden und dass das gesamte bebrütete Material mit größter Sorgfalt entsorgt wird.

Personen, die diese Internationale Norm anwenden, sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Diese Norm erhebt nicht den Anspruch, alle Sicherheitsaspekte erschöpfend zu behandeln, und wenn überhaupt, dann im Zusammenhang mit ihrer Anwendung. Es obliegt der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Gesundheitsschutzmaßnahmen zu treffen und somit die Einhaltung der nationalen gesetzlichen Bestimmungen sicherzustellen.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonellen fest. Zusätzliche Kultivierungsschritte für den Nachweis von *Salmonella* Typhi und *Salmonella* Paratyphi sind in einem Anhang dieser Internationalen Norm festgelegt.

In Abhängigkeit von den in der Einleitung erörterten Einschränkungen gilt diese Internationale Norm für

- Produkte, die für den menschlichen Verzehr oder als Futtermittel bestimmt sind;
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung von Lebensmitteln und beim Umgang mit Lebensmitteln;
- Proben aus der Primärproduktion, wie z. B. Tierkot, Staub, Tupper.

Das selektive Anreicherungsmedium zum Nachweis von Salmonellen in Proben aus der Primärproduktion (MSRV) ist für den Nachweis von beweglichen Salmonellen vorgesehen und nicht für den Nachweis von unbeweglichen Salmonellen und/oder Brillantgrün-empfindlichen Salmonellen-Stämmen geeignet.

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 707, *Milk and milk products: guidance on sampling*

ISO/TR 6579-3, *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 3: Guidelines for serotyping of Salmonella spp.*

ISO 6887-1, *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*

ISO 6887-2, *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products*

ISO 6887-3, *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products*

ISO 6887-4, *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products*

ISO 6887-5, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products*

ISO 6887-6, *Microbiology of food and animal feed — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage*

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 13307, *Microbiology of food and animal feed — Primary production stage — Sampling techniques*

ISO 17604, *Microbiology of the food chain — Carcass sampling for microbiological analysis*

ISO/TS 17728, *Microbiology of the food chain — Sampling techniques for microbiological analysis of food and feed samples*

ISO 18593, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Internationalen Norm gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Salmonellen

Mikroorganismen, die typische oder weniger typische Kolonien auf festen Selektivmedien bilden und bei der Untersuchung nach den in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren die beschriebenen biochemischen und serologischen Eigenschaften aufweisen

3.2

Nachweis von Salmonellen

Feststellung von Salmonellen (3.1) in einer vorgegebenen Menge oder einem vorgegebenen Volumen eines Produkts, auf einer vorgegebenen Fläche oder auf einem Gegenstand (z. B. Sockentupfer) bei der Untersuchung nach den in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Der Nachweis von Salmonellen erfordert vier aufeinander folgende Schritte (siehe auch Anhang A).

ANMERKUNG Salmonellen können in geringer Anzahl anwesend sein und häufig gemeinsam mit einer beträchtlich größeren Anzahl von anderen *Enterobacteriaceae* oder anderen Familien vorkommen. Ferner erfolgt eine Voranreicherung, um den Nachweis einer geringen Anzahl von Salmonellen oder geschädigter Salmonellen zu ermöglichen.

4.2 Voranreicherung in einem nicht selektiven, flüssigen Nährmedium

Gepuffertes Peptonwasser bei Umgebungstemperatur wird mit der Einwaage beimpft und 18 h bei einer Temperatur zwischen 34 °C und 38 °C bebrütet.

Bei bestimmten Lebensmitteln ist die Verwendung anderer Voranreicherungsverfahren notwendig. Siehe 9.1.2.

Bei großen Mengen (z. B. 1 Liter oder mehr) wird empfohlen, das gepufferte Peptonwasser vor der Beimpfung mit der Einwaage auf 34 °C bis 38 °C anzuwärmen.

4.3 Anreicherung in/auf selektiven Nährmedien

Rappaport-Vassiliadis-Medium mit Soja (RVS-Anreicherungsbouillon) oder modifizierter halbfester Agar nach Rappaport-Vassiliadis (MSRV) und eine Muller-Kauffmann-Tetrathionat-Novobiocin-Bouillon (MKTTn-Bouillon) werden mit der nach 4.2 erhaltenen Kultur beimpft.

Die RVS-Bouillon oder der MSRV-Agar wird 24 h bei 41,5 °C und die MKTTn-Bouillon wird 24 h bei 37 °C bebrütet.

Bei einigen Produkten kann es notwendig sein, das (die) selektive(n) Anreicherungsmedium (Anreicherungsmedien) weitere 24 h zu bebrüten.

ANMERKUNG MSRV ist für den Nachweis von beweglichen Salmonellen vorgesehen und nicht für den Nachweis von unbeweglichen Salmonellen und/oder Brillantgrün-empfindlichen Salmonellen-Stämmen geeignet.

4.4 Ausplattierung und Identifizierung

Zwei feste Selektivmedien werden mit den nach 4.3 erhaltenen Kulturen beimpft:

- Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar);
- ein beliebiges anderes festes Selektivnährmedium zur Ergänzung von XLD-Agar (siehe Anhang E).

Der XLD-Agar wird bei 37 °C bebrütet und nach 24 h untersucht. Der zweite Selektivagar wird nach den Empfehlungen des Herstellers bebrütet.

4.5 Bestätigung der Identität

Salmonellenverdächtige Kolonien werden subkultiviert und die Identität wird mit geeigneten biochemischen und serologischen Untersuchungen bestätigt.

5 Nährmedien, Chemikalien und Seren

5.1 Allgemeines

Zur üblichen Laborpraxis siehe ISO 7218.

5.2 Nährmedien und Chemikalien

Der besseren Übersichtlichkeit wegen werden Zusammensetzung und Herstellung der zahlreichen Nährmedien und Chemikalien in Anhang B beschrieben. Alternativ dürfen vollständige Trockennährmedien oder Verdünnungsmittel verwendet werden. In diesem Fall ist nach den Anweisungen des Herstellers vorzugehen.

5.2.1 Nicht selektives Voranreicherungsmedium: Gepuffertes Peptonwasser

Siehe B.1.

5.2.2 Erstes selektives Anreicherungsmedium: Rappaport-Vassiliadis-Medium mit Soja (RVS-Bouillon) oder modifizierter halbfester Agar nach Rappaport-Vassiliadis (MSRV)

Siehe B.2 oder B.3.

5.2.3 Zweites selektives Anreicherungsmedium: Muller-Kauffmann-Tetrathionat-Novobiocin-Bouillon (MKTn-Bouillon)

Siehe B.4.

5.2.4 Feste Selektivmedien für die Ausplattierung

5.2.4.1 Erstes Medium: Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar)

Siehe B.5.

5.2.4.2 Zweites Medium

Die Wahl des zweiten geeigneten Nährmediums liegt im Ermessen des Untersuchungslaboratoriums (siehe Anhang E). Den Anweisungen des Herstellers für die Zubereitung sollte gefolgt werden.

5.2.5 Nicht selektives Agarmedium

Die Wahl des nicht selektiven Agarmediums zur Überprüfung der Reinheit liegt im Ermessen des Untersuchungslaboratoriums. Den Anweisungen des Herstellers für die Zubereitung sollte gefolgt werden. Ein Beispiel für ein nicht selektives Agarmedium ist Nähragar (siehe B.6).

5.2.6 Dreizucker-Eisen-Agar (TSI-Agar)

Siehe B.7.

ANMERKUNG Als Alternative kann ein Zwei-Zucker-Eisen-Agar (Kligler-Hajna) verwendet werden.

5.2.7 Harnstoff-Agar (Christensen)

Siehe B.8.

5.2.8 L-Lysin-Decarboxylase-Medium

Siehe B.9.

5.2.9 Reagenz zum Nachweis von β -Galactosidase (oder vorbereitete Papierscheiben, die entsprechend den Anweisungen des Herstellers zu verwenden sind) — optional

Siehe B.10.

Zusätzlich wird Toluol benötigt.

5.2.10 Medium und Reagenzien für die Indol-Reaktion — optional

Siehe B.11.

5.2.11 Kochsalzlösung

Siehe B.12.

5.3 Antiseren

Im Handel sind mehrere Arten von Seren mit Antikörpern für ein oder mehrere O-Antigene erhältlich, d. h. Antiseren, die eine oder mehrere „O“-Gruppen enthalten (so genannte mono- oder polyvalente Anti-O-Seren), Anti-Vi-Seren und Antiseren, die Antikörper für einen oder mehrere „H“-Faktoren enthalten (so genannte mono- oder polyvalente Anti-H-Seren).

Es sollte jeder Versuch unternommen werden um sicherzustellen, dass die verwendeten Antiseren für den Nachweis aller Salmonellen-Serovare geeignet sind. Empfehlenswert ist diesbezüglich die ausschließliche Verwendung von Antiseren eines als kompetent anerkannten Lieferanten (z. B. durch eine entsprechend zuständige Behörde).

6 Geräte und Glasgeräte

Einweggeräte mit geeigneten Kennwerten sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

Übliche Ausstattung eines mikrobiologischen Labors (siehe ISO 7218) und insbesondere die folgenden Geräte:

6.1 Gerät für die Trockensterilisation (Wärmeschrank) oder Dampfsterilisation (Autoklav)

Siehe ISO 7218.

6.2 Trocknungskammer oder **Wärmeschrank**, Wärmeübertragung durch Umluft, auf Betriebstemperaturen zwischen 25 °C und 50 °C einstellbar.

6.3a Brutschrank, auf einen Bereich zwischen 34 °C und 38 °C einstellbar.

6.3b Brutschrank, auf (37 ± 1) °C einstellbar.

6.4 Brutschrank, auf $(41,5 \pm 1)$ °C einstellbar, oder **Wasserbad**, auf $(41,5 \pm 1)$ °C einstellbar.

6.5 Wasserbad, auf eine Temperatur zwischen 47 °C und 50 °C einstellbar

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

6.7 Wasserbad, auf (45 ± 1) °C einstellbar.

Es wird empfohlen, ein Wasserbad (6.4 bis 6.7) zu verwenden, das wegen der niedrigen Infektionsdosis von Salmonellen einen antibakteriellen Wirkstoff enthält.

6.8 Kühltisch, der bei (5 ± 3) °C betrieben werden kann.

6.9 Sterile Impfüfen von ungefähr 3 mm Durchmesser (Volumen 10 µl) und mit einem Volumen von 1 µl sowie Impfnadel oder Impfdraht.

6.10 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierengenauigkeit von $\pm 0,1$ pH-Einheit bei 20 °C bis 25 °C.

6.11 Kulturröhrchen oder **-kolben**, mit geeignetem Volumen.

Es dürfen Kulturflaschen oder -kolben mit ungiftigen Metall- oder Kunststoff-Schraubverschlüssen verwendet werden.

6.12 Messpipetten oder **automatische Pipetten**, Nennvolumen 10 ml, 1 ml und 0,1 ml.

6.13 Petrischalen, mit einem Durchmesser von etwa 90 mm und (optional) große Petrischalen (Durchmesser etwa 140 mm).

7 Probenahme

Es ist wichtig, dass das Labor eine wirklich repräsentative Probe empfängt, die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

Hinsichtlich der Probenahme von Lebens- und Futtermitteln siehe ISO/TS 17728. Hinsichtlich der Probenahme auf der Stufe der Primärproduktion siehe ISO 13307. Zur Probenahme von Schlachttierkörpern siehe ISO 17604.

Die Probenahme ist kein Bestandteil des in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahrens. Dazu ist die spezielle entsprechende Internationale Norm heranzuziehen, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst. Liegt keine derartige Internationale Norm vor, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Probe ist nach der speziellen Internationalen Norm vorzubereiten, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst. Liegt keine derartige Internationale Norm vor, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

9 Durchführung (siehe Fließschemata in Anhang A)

9.1 Einwaage und Erstverdünnung

9.1.1 Allgemeines

Bezüglich der Vorbereitung der Untersuchungsprobe und Herstellung von Erstverdünnungen für spezifische Produkte siehe die in ISO 6887 (alle Teile) beschriebenen Verfahren.

Das unter 5.2.1 festgelegte Voranreicherungsmedium (gepuffertes Peptonwasser) wird im Allgemeinen als Verdünnungsflüssigkeit für die Herstellung der Erstverdünnung verwendet. Vor dem Gebrauch wird das BPW auf Raumtemperatur vorgewärmt.

Im Allgemeinen wird eine bestimmte Menge an Probe (Masse oder Volumen) so zu einer Menge an BPW (Masse oder Volumen) hinzugefügt, dass eine Verdünnung von 1:10 erreicht wird (im Allgemeinen betrifft das 25 g Probe, die zu 225 ml BPW hinzugefügt werden). Bei einigen Probenarten kann es jedoch notwendig sein, ein anderes Verhältnis zu verwenden (z. B. Sockentupfer).

ANMERKUNG Falls mehr als eine 25-g-Einwaage von einer festgelegten Produktcharge zu untersuchen ist und nachgewiesen werden kann, dass eine Vereinigung der einzelnen Einwaagen das Ergebnis für dieses spezielle Lebensmittel nicht beeinflusst, können die Einwaagen gebündelt (gepoolt) werden. Weiterführende Angaben zum Bündeln von Proben sowie ein Verfahren zur Untersuchung des Einflusses des Bündelns auf die Empfindlichkeit des Verfahrens sind in ISO 6887-1 enthalten.

9.1.2 Spezielle Herstellung der Erstverdünnung für bestimmte Lebensmittel

Die folgenden Herstellungen der Erstverdünnung sind spezifisch für Salmonellen. Spezielle Herstellungen zum Nachweis von verschiedenen Mikroorganismen, einschließlich Salmonellen, werden in ISO 6887-2, ISO 6887-3, ISO 6887-4, ISO 6887-5 und ISO 6887-6 beschrieben.

9.1.2.1 Kakao und kakaohaltige Produkte

Siehe ISO 6887, Teil 4.

9.1.2.2 Saure und ansäuernde Lebensmittel

Siehe ISO 6887, Teil 1 und Teil 4.

9.1.2.3 Rohmilch, wärmebehandelte Milch und flüssige Milchprodukte

25 ml der Untersuchungsprobe werden in einen Kolben (6.11) mit 225 ml BPW (5.2.1) pipettiert und gemischt.

9.1.2.4 Milchpulverprodukte

Ein Kolben (6.11), der mit einem Stopfen verschlossen wird, wird mit 225 ml BPW (5.2.1) vorbereitet.

25 g der Untersuchungsprobe werden unter aseptischen Bedingungen eingewogen und über die Oberfläche der Flüssigkeit im Kolben geschüttet. Der Kolben wird mit einem Stopfen verschlossen, aber nicht geschüttelt. Der Kolben wird vor dem Bebrüten ungestört bei Raumtemperatur (60 ± 10) min stehen gelassen. Eine Einstellung des pH-Wertes ist nicht notwendig. Wenn nach 1 h des Bebrütens das Milchpulver immer noch nicht gelöst ist, wird der Inhalt des Kolbens durch manuelles Schütteln oder Rühren mit einem sterilen Spatel gemischt.

9.1.2.5 Lactose

25 g der Untersuchungsprobe werden unter aseptischen Bedingungen in einen Kolben (6.11), der mit einem Stopfen verschlossen werden kann und 225 ml BPW (5.2.1) enthält, eingewogen und zum Auflösen geschüttelt.

9.1.2.6 Casein, Caseinate, Käse

25 g der Untersuchungsprobe werden unter aseptischen Bedingungen in den sterilen Behälter eines Hochgeschwindigkeitsmischgeräts oder eines Beutel-Walkmischers eingewogen. 225 ml des auf 45 °C vorgewärmten (6.7) BPW (5.2.1) werden dazugegeben. Bis die Untersuchungsprobe vollständig gelöst ist, wird gemischt (1 min bis 3 min). Es ist sicherzustellen, dass die Temperatur der Dispersion 45 °C nicht überschreitet.

9.1.2.7 Butter

25 g Untersuchungsprobe werden unter aseptischen Bedingungen in einen sterilen Kolben (6.11) eingewogen und dieser wird in ein auf 45 °C eingestelltes Wasserbad (6.7) gestellt. Der Kolben wird so lange im Wasserbad belassen, bis die gesamte Einwaage gerade geschmolzen ist. Es werden 225 ml auf 45 °C vorgewärmtes (6.7) BPW (5.2.1) zugegeben und durchmischt.

9.1.2.8 Gefrorene Milchprodukte (einschließlich Speiseeis)

25 ml der geschmolzenen Untersuchungsprobe werden, vorgewärmt auf nicht mehr als 37 °C, in einen Kolben (6.11) mit 225 ml BPW (5.2.1) pipettiert und gemischt.

9.1.2.9 Fermentierte Milch, Joghurt, Eiercremes, Desserts

25 g der Untersuchungsprobe werden unter aseptischen Bedingungen in einen Kolben (6.11), der mit einem Stopfen verschlossen werden kann und Glasperlen sowie 225 ml BPW (5.2.1) enthält, eingewogen und zum Dispergieren geschüttelt.

9.2 Nicht selektive Voranreicherung

Die Erstverdünnung (9.1) wird (18 ± 2) h bei einer Temperatur zwischen 34 °C und 38 °C (siehe 6.3a) bebrütet.

Es ist zulässig, die vorangereicherte Probe nach der Bebrütung bei 5 °C (6.8) für höchstens 72 h aufzubewahren.

9.3 Selektive Anreicherung

9.3.1 Allgemeines

Wenn die selektiven Anreicherungsmedien, RVS oder MSRV (5.2.2) und MKTTn (5.2.3), bei niedrigerer Temperatur aufbewahrt wurden, sind sie auf Raumtemperatur zu bringen.

Die Überführung von Feststoffen aus den Voranreicherungs- in die selektiven Anreicherungsmedien ist auf ein Mindestmaß zu verringern.

Es sollte darauf geachtet werden, dass die maximal zulässigen Bebrütungstemperaturen (38 °C und 42,5 °C) nicht überschritten werden.

Nach der Bebrütung ist eine Aufbewahrung der selektiven Anreicherung für höchstens 72 h bei 5 °C (6.8) zulässig.

9.3.2 Vorgehensweise für Lebensmittel, Futtermittel- und Umgebungsproben aus dem Bereich der Lebensmittelherstellung

0,1 ml der nach 9.2 bebrüteten Kultur werden in ein Kulturröhrchen überführt, das 10 ml RVS-Bouillon (5.2.2) enthält, **oder** auf die Oberfläche einer MSRV-Agar-Platte gegeben (5.2.2). Die MSRV-Platte wird mit 1 bis 3 Tropfen in gleichem Abstand voneinander auf der Oberfläche des Mediums beimpft.

1 ml der nach 9.2 bebrüteten Kultur werden in ein Kulturröhrchen überführt, das 10 ml MKTTn-Bouillon (5.2.3) enthält.

Die beimpfte RVS-Bouillon wird (24 ± 3) h bei 41,5 °C (siehe 6.4) bebrütet.

Die beimpften MSRV-Agar-Platten werden (24 ± 3) h bei 41,5 °C (siehe 6.4) bebrütet. **Die Platten dürfen nicht umgedreht werden.**

Die beimpfte MKTTn-Bouillon wird (24 ± 3) h bei 37 °C (siehe 6.3b) bebrütet.

Positive MSRV-Platten weisen eine grau-weiße, trübe Zone auf, die sich von dem aufgeimpften Tropfen aus ausdehnt. Die trübe Zone ist durch einen weißen Hof mit einem klar abgegrenzten Rand charakterisiert.

In einigen Produkten, wie z. B. Milchpulverprodukten und Käse, können die Salmonellen in hohem Maße subletal geschädigt sein. Bei diesen Produkten ist es notwendig, die selektiven Anreicherungsmedien für weitere 24 h zu bebrüten.

9.3.3 Vorgehensweise für Proben aus der Primärproduktion

Die MSRV-Platten werden mit 0,1 ml der Voranreicherkultur (9.2) in Form von 1 Tropfen bis 3 Tropfen in gleichem Abstand voneinander auf der Oberfläche des Mediums beimpft.

Die beimpften MSRV-Agar-Platten werden (24 ± 3) h bei 41,5 °C (siehe 6.4) bebrütet.

Die Platten dürfen nicht umgedreht werden.

Positive Platten weisen eine grau-weiße, trübe Zone auf, die sich von dem aufgeimpften Tropfen aus ausdehnt. Die trübe Zone ist durch einen weißen Hof mit einem klar abgegrenzten Rand charakterisiert.

Wenn die Platten nach 24 h negativ sind, werden sie für weitere (24 ± 3) h bebrütet.

9.4 Ausplattierung und Identifizierung

9.4.1 Allgemeines

Zwei selektive Isoliermedien werden mit den selektiven Anreicherungskulturen (9.3) beimpft. Das erste Isolierungsmedium ist Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD-Agar). Das zweite Isolierungsmedium wird vom Untersuchungslaboratorium gewählt.

Die Wahl eines zweiten Selektivmediums für den Ausstrich beruht auf anderen diagnostischen Merkmalen im Vergleich zu XLD-Agar, wobei die in Anhang E angeführten Informationen genutzt werden.

Wenn die Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar-Platten (XLD-Agar-Platten) und das zweite Selektivmedium für die Ausplattierung (siehe 5.2.4) bei niedrigerer Temperatur aufbewahrt wurden, sind sie auf Raumtemperatur zu bringen. Falls notwendig, wird die Oberfläche der Platten vor der Verwendung getrocknet.

9.4.2 Vorgehensweise für Lebensmittel, Futtermittel- und Umgebungsproben aus dem Bereich der Lebensmittelherstellung

Auf die Oberfläche einer Petrischale (6.13), die das erste Selektivmedium für die Ausplattierung (XLD-Agar, siehe 5.2.4.1) enthält, wird die in der RVS-Bouillon erhaltene Kultur (9.3.2) mittels einer 10- μ l-Impföse (6.9) abgeimpft, so dass gut voneinander abgesetzte einzelne Kolonien entstehen. In derselben Art und Weise wird das zweite Selektivmedium für die Ausplattierung (5.2.4.2) beimpft.

Von der auf der MSRV-Agar-Platte erhaltenen Kultur (9.3.2) wird der von den Impfstellen am weitesten entfernte Punkt der trüben Schwärmzone bestimmt und eine 1- μ l-Impföse (6.9) wird genau in den Rand der trüben Schwärmzone getaucht. Die Impföse wird herausgezogen, wobei sicherzustellen ist, dass keine großen Klumpen von MSRV-Agar entnommen werden. Die Oberfläche einer XLD-Platte wird so beimpft, dass gut voneinander abgesetzte einzelne Kolonien erhalten werden. In derselben Art und Weise wird das zweite Selektivmedium für die Ausplattierung (5.2.4.2) beimpft.

Auf die Oberfläche einer Petrischale (6.13), die das erste Selektivmedium für die Ausplattierung (XLD-Agar, siehe 5.2.4.1) enthält, wird die in der MKTTn-Bouillon erhaltene Kultur (9.3.2) mittels einer 10- μ l-Impföse (6.9) abgeimpft, so dass gut voneinander abgesetzte einzelne Kolonien entstehen. In derselben Art und Weise wird das zweite Selektivmedium für die Ausplattierung (5.2.4.2) beimpft.

ANMERKUNG 1 Um gut voneinander abgesetzte einzelne Kolonien zu erhalten, können großen Petrischalen mit Medium für die Ausplattierung (Durchmesser etwa 140 mm) zwei normalgroße Platten (Durchmesser etwa 90 mm) verwendet werden.

Die XLD-Platten werden in umgedrehtem Zustand bei 37 °C (siehe 6.3b) (24 ± 3) h bebrütet.

Das zweite Selektivmedium für die Ausplattierung wird nach den Anweisungen des Herstellers bebrütet.

In einigen Produkten, wie z. B. Milchpulverprodukten und Käse, und wenn es als notwendig erachtet wird (z. B. bei der Untersuchung von Krankheitsausbrüchen), ist es notwendig, die selektiven Anreicherungskulturen für weitere 24 h zu bebrüten (besonders im Fall von negativen MSRV-Agar-Platten). Das gleiche Verfahren der Ausplattierung wie vorstehend beschrieben wird angewendet. Das erhöht die Wahrscheinlichkeit eine positive Probe zu finden.

Typische, auf XLD-Agar gewachsene Salmonellenkolonien besitzen ein schwarzes Koloniezentrum und eine leicht transparente rötlich gefärbte Zone wegen des Indikatorfarbumschlags im Medium.

ANMERKUNG 2 Die H₂S-negativen Varianten von Salmonellen wachsen auf XLD-Agar rosa mit einem dunkleren rosa Zentrum. Lactosepositive Salmonellen wachsen auf XLD-Agar gelb mit oder ohne Schwärzung.

Das zweite Selektivmedium für die Ausplattierung wird nach einer geeigneter Bebrütungsdauer auf Anwesenheit von charakteristischen Kolonien, die als präsumtive Salmonellen angesehen werden können, geprüft.