

DIN EN ISO 6888-1



ICS 07.100.30

Entwurf

Einsprüche bis 2020-05-06
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 6888-1:2019-06

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Horizontales Verfahren für die Zählung von koagulase-positiven
Staphylokokken (Staphylococcus aureus und andere Spezies) –
Teil 1: Verfahren mit Baird-Parker-Agar (ISO/DIS 6888-1:2020);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 6888-1:2020**

Microbiology of the food chain –
Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) –
Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium (ISO/DIS 6888-1:2020);
German and English version prEN ISO 6888-1:2020

Microbiologie des aliments –
Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (Staphylococcus aureus et autres espèces) –
Partie 1: Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker (ISO/DIS 6888-1:2020);
Version allemande et anglaise prEN ISO 6888-1:2020

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-03-06 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 55 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 6888-1:2020) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

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

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

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 707	siehe	DIN EN ISO 707
ISO 6887 (all parts)	siehe	DIN EN ISO 6887 (alle Teile)
ISO 6887-3	siehe	DIN EN ISO 6887-3
ISO 6888-2	siehe	DIN EN ISO 6888-2
ISO 7218	siehe	DIN EN ISO 7218
ISO 11133	siehe	DIN EN ISO 11133
ISO 13307	siehe	DIN EN ISO 13307
ISO 16140:2003	siehe	DIN EN ISO 16140:2003-09
ISO 17468	siehe	DIN EN ISO 17468
ISO 17604	siehe	DIN EN ISO 17604
ISO 17728	siehe	DIN CEN ISO/TS 17728
ISO 18593	siehe	DIN EN ISO 18593

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 6888-1:2019-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Titel bezieht sich auf „Lebensmittelkette“;
- b) genaue Angaben zum Status von ISO 6888-1 und ISO 6888-2;
- c) alle Vorkommnisse, wenn angemessen; „35 °C oder 37 °C“ geändert zu „34 °C bis 38 °C“;
- d) Normative Verweisung ISO 11133;
- e) alle verfügbaren Normen auf Probenahmetechniken bezogen;
- f) Beschreibung von typischen und atypischen Kolonien auf BPA;
- g) RPFA als Alternative zur Koagulase-Prüfung zur Bestätigung (aus ISO 6888-1:1999/Amendment 2:2018);
- h) Flussdiagramm-Verfahren in Anhang A;
- i) Nährmedien und Reagenz mit Leistungsnachweis in Anhang B;

- j) Ergebnisse des Ringversuchs (aus ISO 6888-1:1999/Amendment 1:2003 Precision data);
- k) Literaturhinweise aktualisiert;
- l) Norm redaktionell überarbeitet.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

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

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 6887-3, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — 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 6888-2, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren für die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken (Staphylococcus aureus und andere Spezies) — Teil 2: Verfahren mit Kaninchenplasma/Fibrinogen-Agar*

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 13307, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Primärproduktion — Probenahmetechniken*

DIN EN ISO 16140:2003-09, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren (ISO 16140:2003); Deutsche Fassung EN ISO 16140:2003*

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

DIN EN ISO 17604, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Probenahme von Schlachttierkörpern zur mikrobiologischen Untersuchung*

DIN EN ISO 18593, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für Probenahmetechniken von Oberflächen*

Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und andere Spezies) — Teil 1: Verfahren mit Baird-Parker-Agar (ISO/DIS 6888-1:2020)

*Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) — Partie 1: Technique utilisant le milieu gélosé de Baird-Parker (ISO/DIS 6888-1:2020)*

*Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium (ISO/DIS 6888-1:2020)*

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	8
5 Kulturmedien und Reagenzien	8
6 Ausrüstung und Verbrauchsmittel	9
7 Probenahme	9
8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe	10
9 Durchführung	10
9.1 Einwaage, Erstverdünnung und weitere Verdünnungen	10
9.2 Beimpfung und Bebrütung	10
9.3 Zählen von Kolonien	11
9.4 Bestätigung	12
9.4.1 Allgemeines	12
9.4.2 Röhrchenprüfung	12
9.4.3 Plattenprüfung mit RPFA	13
10 Angabe der Ergebnisse	13
11 Leistungskenngrößen des Verfahrens	14
11.1 Laborvergleichsuntersuchung	14
11.2 Wiederholgrenze	14
11.3 Vergleichsgrenze	15
12 Untersuchungsbericht	16
13 Qualitätssicherung	16
Anhang A (normativ) Flussdiagramm des Verfahrens	17
Anhang B (normativ) Kulturmedien und Reagenzien	18
Anhang C (informativ) Ergebnisse des Ringversuchs	25
Literaturhinweise	28

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 6888-1:2020) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 6888-1:1999 + A1:2003 + A2:2018 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 6888-1:2020 wurde von CEN als prEN ISO 6888-1:2020 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

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

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-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. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

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

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

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food Products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology* erarbeitet.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 6888-1:1999), die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- Titel bezieht sich auf „Lebensmittelkette“;
- genaue Angaben zum Status von ISO 6888 Teil 1 und Teil 2;
- alle Vorkommnisse, wenn angemessen; „35 °C oder 37 °C“ geändert zu „34 °C bis 38 °C“;
- Normative Verweisungen ISO 11133;
- alle verfügbaren Normen auf Probenahmetechniken bezogen;
- Beschreibung von typischen und atypischen Kolonien auf BPA;
- RPFA als Alternative zur Koagulase-Prüfung zur Bestätigung (aus ISO 6888-1:1999/Amendment 2:2018);
- Flussdiagramm-Verfahren in Anhang A;

- Nährmedien und Reagenz mit Leistungsnachweis in Anhang B;
- Ergebnisse des Ringversuchs (aus ISO 6888-1:1999/Amendment 1:2003 Precision data);
- Literaturhinweise aktualisiert.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 6888 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Einleitung

1.1 Wegen der Vielzahl von Lebensmitteln und Futtermitteln ist dieses horizontale Verfahren möglicherweise nicht bis ins Einzelne für bestimmte Produkte geeignet. In diesem Falle dürfen unterschiedliche Verfahren, die speziell auf diese Produkte zutreffen, angewendet werden, wenn dies aus fachlichen Gründen absolut notwendig ist. Dennoch sollte stets versucht werden, diesem horizontalen Verfahren so weit wie möglich zu folgen.

Bei der nächsten Überarbeitung von ISO 6888 werden sämtliche dann zur Verfügung stehenden Informationen über die Akzeptanz dieser Norm und die Gründe für Abweichungen bei einzelnen Produkten berücksichtigt werden.

Die Harmonisierung der Untersuchungsverfahren kann nicht sofort erfolgen. Für bestimmte Produktgruppen können bereits Internationale Normen und/oder nationale Normen bestehen, die diesem horizontalen Verfahren nicht entsprechen. Es ist jedoch zu hoffen, dass diese Normen bei einer Überarbeitung an diesen Teil von ISO 6888 angepasst werden, sodass es sich bei den verbleibenden Abweichungen von dem horizontalen Verfahren nur noch um solche handelt, die fachlich begründet sind.

1.2 ISO 6888 beschreibt drei horizontale Verfahren (Teil 1, Teil 2 und Teil 3) für den Nachweis und die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken, zu denen enterotoxische Stämme gezählt werden. Hier ist hauptsächlich *Staphylococcus aureus*, gemeint, aber auch *S. intermedius* und einige Stämme von *S. hyicus*.

„Die Teile 1 und 2 von ISO 6888 sind gleichwertig. Es wird jedoch empfohlen, das in ISO 6888-2 beschriebene Verfahren (siehe Literaturhinweis [3]) für solche Lebensmittel (wie z. B. Rohmilchkäse und bestimmte rohe Fleischerzeugnisse) zu verwenden, die wahrscheinlich kontaminiert sind durch:“

- Staphylokokken, die auf Baird-Parker-Agar atypische Kolonien bilden;
- Begleitflora, die die gesuchten Kolonien überdecken kann.

1.3 In diesem Teil von ISO 6888 beruht die Bestätigung von typischen und atypischen Kolonien auf einer stark positiven Koagulase Reaktion, es ist jedoch zu beachten, dass einige Stämme von *Staphylococcus aureus* schwach positive Koagulase-Reaktionen aufweisen. Diese letztgenannten Stämme können mit anderen Bakterien verwechselt werden, sie können jedoch von diesen Bakterien mit zusätzlichen Prüfungen, die nicht in diesem Teil von ISO 6888 enthalten sind, unterschieden werden, wie z. B. anhand der Lysostaphin-Empfindlichkeit und der Bildung von Hämolysin, von Thermonuklease und von Mannit (siehe ISO 7218 und Literaturhinweis [9]).

Die größten fachlichen Änderungen, die im Vorwort aufgeführt sind und in diesem Dokument im Vergleich zu ISO 6888-1 (1999) eingeführt wurden, werden als geringfügig betrachtet (siehe ISO 17468). Sie haben lediglich einen geringen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des Verfahrens.

WARNUNG — Zum Schutz der Gesundheit des Laborpersonals ist es wesentlich, die Prüfungen zum Nachweis von Staphylokokken nur in angemessen ausgerüsteten Laboratorien durchzuführen, wobei die Prüfung unter der Leitung eines erfahrenen Mikrobiologen erfolgt, und dass bei der Entsorgung von bebrüteten Materialien mit großer Sorgfalt vorgegangen wird. Anwender dieser Norm sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortlichkeit des Anwenders, geeignete Gesundheits- und Sicherheitsmaßnahmen festzulegen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein horizontales Verfahren für die Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken in Lebensmitteln und Futtermitteln fest. In diesem Verfahren werden nach aerober Inkubation bei 34 °C bis 38 °C auf einem festen Medium (Baird-Parker-Agar) erhaltene Kolonien gezählt und bestätigt.

Dieses Dokument gilt für:

- Erzeugnissen, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind,
- Erzeugnissen, die als Futtermittel vorgesehen sind,
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und Handhabung von Lebensmitteln und Futtermitteln, und
- Proben aus dem Bereich der Primärproduktion.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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 (all parts), *Microbiology of the food chain — Rules for the preparation of the test sample, of initial suspension and of 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*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

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

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

koagulase-positive Staphylokokken

Mikroorganismen, die auf der Oberfläche eines selektiven Nährmediums (Baird-Parker-Agar-Medium) **typische** und/oder **atypische** Kolonien bilden und eine positive Koagulase-Reaktion in einer Röhrchenprüfung oder an Kaninchen-Plasma-Fibrinogen-Agar zeigen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die typischen und atypischen Kolonien sind in Abschnitt 9.3.1 beschrieben.

3.2

Zählung von koagulase-positiven Staphylokokken

Bestimmung der Anzahl von koagulase-positiven Staphylokokken (3.1) je Gramm, je Millimeter, je Quadratzentimeter oder je Probenahmegerät

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Die Oberflächen eines festen selektiven Nährmediums werden mit einer festgelegten Menge der Untersuchungsprobe oder mit einer festgelegten Menge der Erstverdünnung bei anderen Produkten beimpft.

Unter denselben Bedingungen werden zwei Platten je Verdünnungsstufe mit Dezimalverdünnungen der Untersuchungsprobe oder der Erstverdünnung beimpft.

4.2 Bebrütung

Die Platten werden aerob bei 34 °C bis 38 °C bebrütet und nach 24 h wie auch nach 48 h überprüft.

4.3 Zählung und Bestätigung

4.4 Die Anzahl der koagulase-positiven Staphylokokken je Gramm, je Millimeter, je Quadratzentimeter oder je Probenahmegerät der Probe wird aus der Anzahl der typischen und/oder atypischen Kolonien auf den Platten berechnet, wobei die Verdünnungen so gewählt werden, dass ein signifikantes Ergebnis erhalten und durch einen positiven Koagulase-Test bestätigt wird.

ANMERKUNG Siehe Anhang A für ein Flussdiagramm.

5 Kulturmedien und Reagenzien

Es ist die übliche Laborpraxis nach ISO 7218 zu beachten. Die Zusammensetzung von Nährmedien und Reagenzien sowie deren Herstellung sind in Anhang B festgelegt. Für die Leistungsprüfung von Kulturmedien sind die Verfahren nach Anhang B und/oder ISO 11133 zu beachten.

Für das/die Verdünnungsmittel, siehe relevanten Teil der Normenreihe ISO 6887.

Es können kommerziell erhältliche Medien in Übereinstimmung mit diesem Dokument verwendet werden. Dennoch wird in Anbetracht der bekannten Variabilität hergestellter Lose des Präparats empfohlen, dass jede Charge Rinderfibrinogen-/Kaninchenplasmalösung vor der Anwendung mittels Positiv- und Negativkontrollen geprüft wird.

6 Ausrüstung und Verbrauchsmittel

Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten, wenn sie geeignete Spezifikationen besitzen.

Übliche mikrobiologische Ausrüstung (siehe ISO 7218) und im Besonderen:

6.1 Geräte für die Trockensterilisierung (Wärmeschränk) oder Dampfsterilisierung (Autoklav).

Siehe ISO 7218.

6.2 Brutschrank, der in der Lage ist, die beimpften Medien im Temperaturbereich von 34 °C bis 38 °C zu halten.

ANMERKUNG Der Bereich zwischen 34 °C und 38 °C für die Inkubation von Medien umfasst die Verwendung eines Brutschranksatzes bei $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ oder $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.3 Trockenschrank oder Wärmeschränk, regelbar zwischen 25 °C und 50 °C.

6.4 Wasserbäder, oder ähnliche Geräte, die in der Lage sind, eine Temperatur von 44 °C bis 47 °C aufrechtzuerhalten.

6.5 Sterile Röhrchen, Kolben oder Flaschen mit Kappen und mit geeigneten Volumen. Kolben oder Flaschen mit ungiftigen Schraubkappen aus Metall oder Kunststoff dürfen verwendet werden.

6.6 Sterile Petrischalen mit einem Durchmesser von etwa 90 mm sowie (optional) größere mit einem Durchmesser von etwa 140 mm.

6.7 Gerader Draht, (siehe ISO 7218) oder Pasteurpipette.

6.8 Sterile graduierte Pipetten oder automatische Pipetten mit einem Nennvolumen von 1 ml, 2 ml und 10 ml, in 0,1 ml, 0,1 ml bzw. 0,5 ml Skaleneinteilung.

Sterile Pasteur- oder graduierte Pipetten und Pipettenspitzen sollten mit einem nicht absorbierenden Wattepfropfen versehen werden, um eine Kontamination zu verhindern, wenn sie zur Behandlung mikrobieller Kulturen verwendet werden.

6.9 Spatel, steril, aus Glas oder Kunststoff.

6.10 pH-Messgerät, mit einer Ablesegenauigkeit von 0,01-pH-Einheiten und Messgenauigkeiten mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,1$ -pH-Einheiten. Das pH-Messgerät muss entweder über eine manuelle oder automatische Temperaturkompensation verfügen.

6.11 Kühlschrank, regelbar auf $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

7 Probenahme

Die Probenahme ist in diesem Dokument nicht festgelegt. Beachten Sie die spezifische internationale Norm, die sich mit dem betreffenden Produkt befasst. Liegt keine spezifische Internationale Norm vor, die sich mit der betreffenden Probe befasst, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

Empfohlene Probenahmetechniken sind in den nachfolgenden Dokumenten angegeben:

- ISO/TS 17728 für Lebens- und Futtermittel [7];
- ISO 707 für Milch und Milchprodukte [1];
- ISO 6887-3 für Fisch und Fischereierzeugnisse [17];
- ISO 13307 für die primäre Produktionsstufe [4];
- ISO 17604 für Kadaver [6];
- ISO 18593 für Oberflächen [8].

Es ist wichtig, dass das Laboratorium eine repräsentative Probe erhält, die während des Transportes oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

8 Vorbereitung der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe wird in Übereinstimmung mit der das betreffende Produkt behandelnden spezifischen internationalen Norm auf Basis der Laborprobe vorbereitet: Es sind die in ISO 6887 (alle Teile) und, falls erforderlich, ISO 18593 angegebenen Verfahren zu beachten. Liegt keine spezifische Internationale Norm vor, wird den Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

9 Durchführung

9.1 Einwaage, Erstverdünnung und weitere Verdünnungen

Siehe relevanten Teil der Normenserie ISO 6887.

9.2 Beimpfung und Bebrütung

9.2.1 Mit einer sterilen Pipette (6.8) 0,1 ml der Untersuchungsprobe, sofern flüssig, oder 0,1 ml der Ausgangssuspension (10^{-1} -Verdünnung) bei anderen Produkten auf eine Agarplatte (B.2) übertragen. Bei Zählungstechniken in der Lebensmittelmikrobiologie wird eine Platte pro Verdünnung mit mindestens zwei aufeinander folgenden Verdünnungen verwendet. Dieser Verfahrensschritt wird für die 10^{-2} -Verdünnung und, falls erforderlich, für weitere Dezimalverdünnungen wiederholt. Wenn nur eine Lösung plattiert ist müssen zwei Platten verwendet werden.

9.2.2 Sofern es erwünscht ist, für bestimmte Proben geringe Anzahlen von koagulase-positiven Staphylokokken zu zählen, kann die Nachweisgrenze um den Faktor 10 erniedrigt werden, indem 1,0 ml der flüssigen Untersuchungsprobe oder 1,0 ml der Erstverdünnung bei anderen Proben entweder auf die Oberfläche einer großen Agarplatte (Ø 140 mm) oder auf die Oberfläche von drei kleinen Agarplatten (Ø 90 mm) aufgetragen werden. Außerdem werden Doppelbestimmungen unter Verwendung von drei weiteren kleinen Agarplatten oder einer großen Agarplatte durchgeführt (siehe ISO 7218).

9.2.3 Das Inokulum wird mit dem Spatel (6.9) so schnell wie möglich und möglichst ohne Berührung der Seitenwände der Petrischale auf der Agaroberfläche verteilt. Die Platten werden mit aufgesetzten Deckeln etwa 15 min bei Raumtemperatur getrocknet.

ANMERKUNG Für die Beimpfung mit Ausplattierungsgerät, siehe ISO 7218.

9.2.4 Die nach 9.2.3 vorbereiteten Platten werden umgedreht und $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ und dann weitere $48\text{ h} \pm 4\text{ h}$ im Brutschrank (6.2) bei 34 °C bis 38 °C bebrütet.

ANMERKUNG Kolonien mit typischem Aussehen nach $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ Bebrütung können nach $48\text{ h} \pm 4\text{ h}$ Bebrütung ihr typisches Aussehen verlieren, aufgrund enzymatischer Prozesse (Trypsin) des Sekundärwachstums oder aufgrund von Überwachsen durch Sekundärwachstum. Das Zählen nur bei $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ kann zu geringen oder gar keinen Zählwerten führen.

9.3 Zählen von Kolonien

9.3.1 Nach einer Bebrütungszeit von $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ werden die Positionen der vorhandenen typischen Kolonien auf der Unterseite der Platten markiert (siehe Anmerkung 1 unten).

Alle Platten werden weitere $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ bei 34 °C bis 38 °C bebrütet, wobei neue typische Kolonien markiert werden; auch atypische Kolonien werden markiert (siehe Anmerkung 2 unten).

Für die Zählung werden nur die Platten herangezogen, die höchstens 300 Kolonien aufweisen, von denen höchstens 150 typische und/oder atypische Kolonien von zwei aufeinander folgenden Verdünnungsstufen herrühren. „Auf einer dieser Platten müssen mindestens 10 Kolonien gewachsen sein. Für die Bestätigung (9.4) wird eine gegebene Anzahl A (im Allgemeinen 5 typische Kolonien, wenn nur typische Kolonien vorhanden sind, oder 5 atypische Kolonien, wenn nur atypische Kolonien vorhanden sind, oder 5 typische Kolonien und 5 atypische Kolonien, wenn beide Kolonienarten vorhanden sind) von jeder Platte ausgewählt.“

Sind auf Platten, die mit unverdünnten flüssigen Proben oder mit der niedrigsten Verdünnungsstufe von anderen Proben beimpft wurden, weniger als 10 typische und/oder atypische Kolonien gewachsen, kann die Anzahl nach der Beschreibung in 9.3.3 und ISO 7218 geschätzt werden.

ANMERKUNG 1 **Typische Kolonien** sind schwarz oder grau, glänzend und gewölbt (1 mm bis 1,5 mm Durchmesser nach $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ Bebrütung und 1,5 mm bis 2,5 mm Durchmesser nach $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ Bebrütung) und sind von einer klaren Zone umgeben, die teilweise trübe sein kann. Nach mindestens 24 h Bebrütung kann in dieser klaren Zone ein opalisierender Ring auftreten, der die Kolonien unmittelbar berührt.

ANMERKUNG 2 **Atypische Kolonien** haben die gleiche Größe wie die typischen Kolonien und können eine der folgenden Eigenschaften aufweisen:

- glänzende, schwarze Kolonien mit oder ohne einen engen weißen Rand; die klare Zone ist nicht oder nur kaum zu sehen, und der opalisierende Ring ist nicht oder nur schwer zu sehen;
- graue Kolonien ohne klare Zonen.

Atypische Kolonien werden häufig durch koagulase-positive Staphylokokkenstämme, die z. B. Milcherzeugnisse, Shrimps und Geflügelteile kontaminieren, gebildet. Sie werden weniger häufig von koagulase-positiven Staphylokokkenstämmen gebildet, die andere Proben kontaminieren.

ANMERKUNG 3 **Andere Kolonien** sind alle möglichen übrigen Kolonien auf den Platten, die weder ein typisches noch ein atypisches Aussehen, wie in den Anmerkungen 1 und 2 beschrieben, haben. Sie werden als Begleitflora betrachtet.

ANMERKUNG 4 Bakterien, die zu anderen Gattungen als Staphylokokken gehören, können Kolonien mit einem staphylokokkenähnlichen Aussehen bilden. Die mikroskopische Untersuchung der Gramfärbung vor der Bestätigung ermöglicht die Unterscheidung anderer Gattungen von Staphylokokken.

9.3.2 Wurde 1,0 ml Impfkultur auf drei Platten verteilt (siehe 9.2.2), werden diese Platten bei allen folgenden Zählungen und Bestätigungsverfahren wie eine Platte behandelt.

9.3.3 Um niedrigere Anzahlen von koagulase-positiven Staphylokokken zu zählen, werden alle Platten zurückbehalten, die typische und atypische Kolonien enthalten. Alle derartigen Kolonien werden für die Bestätigung innerhalb der oben festgesetzten Grenzen ausgewählt.

9.4 Bestätigung

9.4.1 Allgemeines

Die Bestätigung von koagulase-positiven Staphylokokken erfolgt mittels einer Röhrchenprüfung (9.4.2). Alternativ kann sie mittels einer Plattenprüfung unter Verwendung von RPFA (9.4.3) (siehe Literaturhinweise [14], [15] und [16]) durchgeführt werden.

ANMERKUNG Um Isolate als koagulase-positive Staphylokokken zu bestätigen, kann ein alternatives Verfahren nach ISO 7218 angewendet werden, sofern die Eignung des relevanten Verfahrens verifiziert wurde.

9.4.2 Röhrchenprüfung

Eine Impfkultur wird mit einem sterilen Impfdraht (6.7) von der Oberfläche jeder ausgewählten Kolonie (9.3) entnommen und in ein Röhrchen oder eine Flasche mit Hirn-Herz-Nährbouillon (B.3) übertragen.

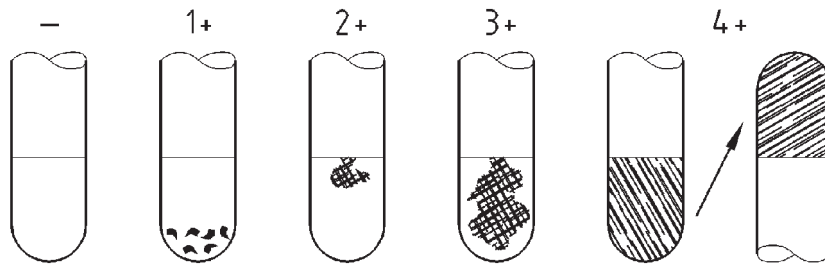
Der Bouillon wird $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ bei 34 °C bis 38 °C bebrütet.

0,1 ml jeder Kultur wird aseptisch in sterile Hämolyseröhrchen oder Flaschen (6.5), die 0,3 ml Kaninchenplasma (B.4) enthalten (falls nicht andere Mengen vom Hersteller festgelegt sind), übertragen und bei 34 °C bis 38 °C bebrütet.

Durch Kippen des Röhrchens wird das Plasma nach 4 h bis 6 h Bebrütung auf Koagulation überprüft. Wenn das Plasma nicht koaguliert hat, wird nach weiteren $24\text{ h} + 2\text{ h}$ Bebrütung erneut geprüft oder nach einer Bebrütungszeit, die vom Hersteller festgelegt wurde.

Der Koagulase-Test wird als positiv beurteilt, wenn die Kulturen mindestens 3+ Koagulasereaktionen nach der Auswertungsrichtlinie in Bild 1 ergeben. Reaktionen von 1+ bis 2+ werden als mittelmäßig betrachtet.

Zur negativen Kontrolle werden bei jeder Plasmacharge 0,1 ml sterile Hirn-Herz-Nährbouillon (B.3) zu der empfohlenen Menge an Kaninchenplasma (B.4) gegeben und bebrütet. Der Test ist gültig, wenn das Kontrollplasma keine Anzeichen einer Klumpenbildung aufweist.



Legende

PUNKTZAHL

–	Keine Klumpen
1+	Kleine(r) unorganisierte(r) Klumpen
2+	Mittlerer kleiner Klumpen
3+	Großer organisierter Klumpen
4+	Der gesamte Inhalt des Röhrchens koaguliert und bewegt sich nicht, wenn das Röhrchen umgedreht wird

INTERPRETATION DER KOAGULASE BEI 24 H

Negativ
Mittlere müssen anhand eines anderen Verfahrens bestätigt werden
Mittlere müssen anhand eines anderen Verfahrens bestätigt werden
Positiv
Positiv

Bild 1 — Bewertung der Koagulase-Prüfreaktionen

9.4.3 Plattenprüfung mit RPFA

Eine Impfkultur wird mit einem sterilen Impfdraht (6.7) von der Oberfläche jeder ausgewählten Kolonie (9.3.1) entnommen und per Stechbeimpfung auf RPFA-Platten (B.5) aufgebracht.

Zusätzlich zu einem positiven Kontrollstamm und einem negativen Kontrollstamm können mehrere Kolonien auf eine Platte beimpft werden, wenn dies so geschieht, dass die einzelnen Kolonien gut voneinander abgetrennte Niederschlagszonen zeigen.

ANMERKUNG Als Richtlinie können bis zu zehn Kolonien auf einer Platte beimpft werden.

Die Platten werden bei 34 °C bis 38 °C für 24 h bis 48 h bebrütet.

Nach der Bebrütung bilden die Staphylokokken schwarze, graue oder sogar weiße kleine Kolonien, die von einem auf Koagulaseaktivität hinweisenden Niederschlagsrand umgeben sind.

Vor der Auswertung können die Platten in einem Kühlschrank für 24 h bis 48 h bei 5 °C ± 3 °C aufbewahrt werden.

10 Angabe der Ergebnisse

Zur Berechnung der Ergebnisse muss das/müssen die Verfahren nach ISO 7218 beachtet werden. Die Ergebnisse werden als die Anzahl von koagulase-positiven Staphylokokken in KBE je Gramm, je Millimeter, je Quadratzentimeter oder je Probenahmegerät berechnet und berichtet.

In Fällen, in denen keine Kolonien des Zielorganismus nachgewiesen wurden, muss ISO 7218 für die Angabe der Ergebnisse für Sonderfälle beachtet werden.