

DIN EN ISO 7932/A1



ICS 07.100.30

Entwurf

Einsprüche bis 2018-12-19
Vorgesehen als Änderung von
DIN EN ISO 7932:2005-03

**Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln –
Horizontales Verfahren zur Zählung von präsumtivem *Bacillus cereus* –
Koloniezählverfahren bei 30 °C – Änderung 1: Aufnahme optionaler
Testmethoden (ISO 7932:2004/DAM 1:2018);
Deutsche und Englische Fassung EN ISO 7932:2004/prA1:2018**

Microbiology of food and animal feeding stuffs –
Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* –
Colony-count technique at 30 degrees C – Amendment 1: Inclusion of optional tests
(ISO 7932:2004/DAM 1:2018);
German and English version EN ISO 7932:2004/prA1:2018

Microbiologie des aliments –
Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présumptifs –
Technique par comptage des colonies à 30 degrés C – Amendement 1: Ajout de tests optionnels
(ISO 7932:2004/DAM 1:2018);
Version allemande et anglaise EN ISO 7932:2004/prA1:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-10-19 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, 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

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 7932:2004/prA1:2018) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitskreis NA 057-01-06-02 AK „Sporenbildende Bakterien“ im DIN Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

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 20837	siehe DIN EN ISO 20837
ISO 20838	siehe DIN EN ISO 20838
ISO 22119	siehe DIN EN ISO 22119
ISO 22174	siehe DIN EN ISO 22174
ISO/TS 17919:2013	siehe DIN CEN ISO/TS 179191 (DIN SPEC 10793):2014-03

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TS 179191 (DIN SPEC 10793):2014-03, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Nachweis von Botulinum-Neurotoxin Typ A, B, E und F produzierenden Clostridien (ISO/TS 17919:2013); Deutsche Fassung CEN ISO/TS 17919:2013*

DIN EN ISO 20837, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis*

DIN EN ISO 20838, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Anforderungen an Amplifikation und Nachweis bei qualitativen Verfahren*

DIN EN ISO 22119, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe*

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

**Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales
Verfahren zur Zählung von präsumtivem *Bacillus cereus* —
Koloniezählverfahren bei 30 °C - Änderung 1: Aufnahme optionaler
Testmethoden (ISO 7932:2004/DAM 1:2018)**

*Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement de Bacillus cereus présumptifs —
Technique par comptage des colonies à 30 degrés C - Amendement 1: Ajout de tests optionnels
(ISO 7932:2004/DAM 1:2018)*

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of presumptive Bacillus
cereus — Colony-count technique at 30 degrees C - Amendment 1: Inclusion of optional tests
(ISO 7932:2004/DAM 1:2018)*

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.9d

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 7932:2004/prA1:2018) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 7932:2004 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 7932:2004/DAM 1:2018 wurde von CEN als EN ISO 7932:2004/prA1:2018 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Seite 6 nach Unterabschnitt 9.4

Unterabschnitt 9.5 einfügen

9.5 Optionale Prüfungen

Alle nachfolgend genannten Prüfungen sind optional und für ergänzende (d.h. epidemiologische) Untersuchungen nach den in den Anhängen C bis F beschriebenen Verfahren an isolierten, nach 9.4.1 erhaltenen Stämmen der *B.-cereus*-Gruppe vorgesehen.

9.5.1 Nachweis der *cytK-1*- oder *cytK-2*-Varianten des für Zytotoxin K codierenden Gens

Einige Stämme der Bakterien der *B.-cereus*-Gruppe sind Träger einer der zwei Varianten des für Zytotoxin K codierenden Gens, *cytK-1* und *cytK-2*. Das *cytK-1*-Gen ist spezifisch für *B. cytotoxicus* [17] [22] und bietet somit eine Möglichkeit der raschen Identifizierung von *B. cytotoxicus* [20]. Das Verfahren in Anhang C beschreibt ein schnelles und validiertes PCR-Verfahren, das beide *cytK*-Genvarianten erfasst und, sofern vorhanden, anzeigt, welche der beiden Formen vorliegt. Es ermöglicht auch, Isolate von *B. cytotoxicus* zu identifizieren.

9.5.2 Nachweis von [Cereulid-produzierenden] Stämmen der *Bacillus-cereus*-Gruppe [, die Cereulid produzieren können]

Einige Bakterienstämme der *B.-cereus*-Gruppe sind in der Lage, ein hitzestabiles Dodekadepeptid zu produzieren, das als Cereulid bezeichnet wird. Dieses Cereulid kann, wenn es in Lebensmitteln produziert wird, eine emetische Lebensmittelvergiftung verursachen.

An der nicht-ribosomalen Produktion des Cereulids ist das Cereulid-Peptidsynthetase-(*ces*-)Gen beteiligt [16]. Das Verfahren in Anhang D beschreibt ein schnelles und validiertes PCR-Verfahren zum Nachweis des *ces*-Gens.

9.5.3 Motilitäts- und Hämolyseprüfungen

Diese Tests ermöglichen es, die präsumtive Anwesenheit von *B. anthracis* in einem Bakterienisolat der *B.-cereus*-Gruppe zu überprüfen.

ANMERKUNG Diese Prüfungen unterliegen starken Einschränkungen, die in Anhang E (Abschnitt E.1 und Tabelle E.1) dargelegt werden.

9.5.4 Mikroskopische Untersuchung des parasporalen Kristalls von *B. thuringiensis*

Die Spezies *B. thuringiensis*, die zur *B.-cereus*-Gruppe gehört, kann durch eine mikroskopische Untersuchung des parasporalen Kristalls, der von isolierten Stämmen dieser Spezies unter den in Anhang F beschriebenen Sporulationsbedingungen gebildet werden kann, von den anderen Spezies dieser Gruppe unterschieden werden.

Seite 12 nach Anhang B

Die folgenden Anhänge C, D, E und F einfügen:

Anhang C (informativ)

Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis der Varianten *cytK-1* bzw. *cytK-2* des Zytotoxin K codierenden Gens in isolierten Stämmen der *Bacillus-cereus*-Gruppe und zur Identifizierung von *B. cytotoxicus*

C.1 Einleitung

Das chromosomal lokalisierte *cytK-2*-Gen codiert für Zytotoxin K, ein Enterotoxin, das nur in *B. cereus* sensu stricto und *B. thuringiensis* vorkommt [22], auch wenn nicht alle Stämme Träger des *cytK-2*-Gens sind. Das *cytK-1*-Gen ist eine Variante des *cytK-2*-Gens, bei dem ein Genpolymorphismus manifestiert ist, und codiert für eine stärker zytotoxische Form des Zytotoxins K, das nur in *B. cytotoxicus* vorkommt [18].

Dieses Verfahren ist auf gut isolierte Kolonien von Stämmen der *B.-cereus*-Gruppe nach geeigneter Präparation der DNA anwendbar.

C.2 Kurzbeschreibung

C.2.1 Allgemeines

Das Verfahren besteht aus den folgenden nacheinander durchzuführenden Schritten:

- a) Nukleinsäure-Extraktion
- b) Amplifikation des Zielgens und Auswertung

C.2.2 Nukleinsäure-Extraktion

Die Bakterienzellen werden aus gut isolierten Kolonien gewonnen, und daraus wird die Nukleinsäure extrahiert, welche in der anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert wird.

C.2.3 Amplifikation des Zielgens und Auswertung

Die extrahierte Nukleinsäure wird selektiv mittels PCR vervielfältigt (amplifiziert). Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgt durch Elektrophorese auf Agarose. Die Auswertung wird anhand des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins der erwarteten Bande vorgenommen.

C.3 Reagenzien

C.3.1 Allgemeines

Alle Reagenzien, die für das in diesem Anhang beschriebene Verfahren benötigt werden, weisen einen für die Molekularbiologie geeigneten Reinheitsgrad auf; dies gilt auch für sämtliche Verbrauchsmaterialien. Sie müssen wie in ISO 20837 [10] und ISO 20838 [11] festgelegt verwendet werden.

C.3.2 Nukleinsäure-Extraktion

Das Verfahren der Nukleinsäure-Extraktion und die verwendeten Reagenzien müssen für grampositive Bakterien geeignet sein.

Es können auch im Handel erhältliche Reagenzien-Kits verwendet werden.

C.3.3 Reagenzien für die PCR

Siehe ISO 22174 [13] und ISO 20838 [11].

C.3.4 Primer

Die zum Nachweis von Zytotoxin-K-Genen eingesetzten Primer sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle C.1 — Sequenzen der Oligonukleotide, Merkmale und resultierendes Amplikon

Primer		Sequenz (5' —> 3')	Genvariante	Position auf <i>cytK</i> -Gen	Größe des Ampli- kons (bp)
CK1F	F	CAA TTC CAG GGG CAA GTG TC	<i>cytK-1</i> Zugangs- nummer ^a DQ885233.1	314–333	426
CK1R	R	CCT CGT GCA TCT GTT TCA TGA G		740–719	
CK2F	F	CAA TCC CTG GCG CTA GTG CA	<i>cytK-2</i> Zugangs- nummer ^a AJ318876.2	314–333	585
CK2R	R	GTG IAG CCT GGA CGA AGT TGG		899–879	
F: Vorwärts-Primer; R: Rückwärts-Primer					
^a Es ist auf die öffentlich zugänglichen Nukleotidsequenzen Bezug zu nehmen, die unter http://www.ncbi.nlm.nih.gov verfügbar sind.					

C.4 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

C.4.1 Ausrüstung für die Nukleinsäure-Extraktion

C.4.1.1 Mikrozentrifugenröhrchen, mit einem Nennvolumen von 1,5 ml und 2,0 ml.

C.4.1.2 Zentrifuge, für Reaktionsröhrchen mit einem Nennvolumen von 1,5 ml und 2,0 ml und mit der Fähigkeit, Beschleunigungswerte von bis zu 14 000 × *g* zu erreichen.

C.4.1.3 Thermoblock, mit einer Heizleistung von bis zu 100 °C.

C.4.1.4 Graduierte Pipetten und Filter-Pipettenspitzen, für Volumina zwischen 1 µl und 1 000 µl.

C.4.1.5 Mischer

C.4.2 Ausrüstung für die PCR

C.4.2.1 PCR-Thermocycler

C.4.2.2 Dünnwandige PCR-Mikroröhrchen, 0,2-ml- oder 0,5-ml-Reaktionsröhrchen, PCR-Mikroplatten mit mehreren Vertiefungen (Multi-Well-Platten) oder andere geeignete Ausrüstung.

C.4.3 Ausrüstung für den Nachweis der PCR-Produkte

Siehe ISO 20838 [11].

C.5 Durchführung

C.5.1 Allgemeines

Siehe Bild C.1.

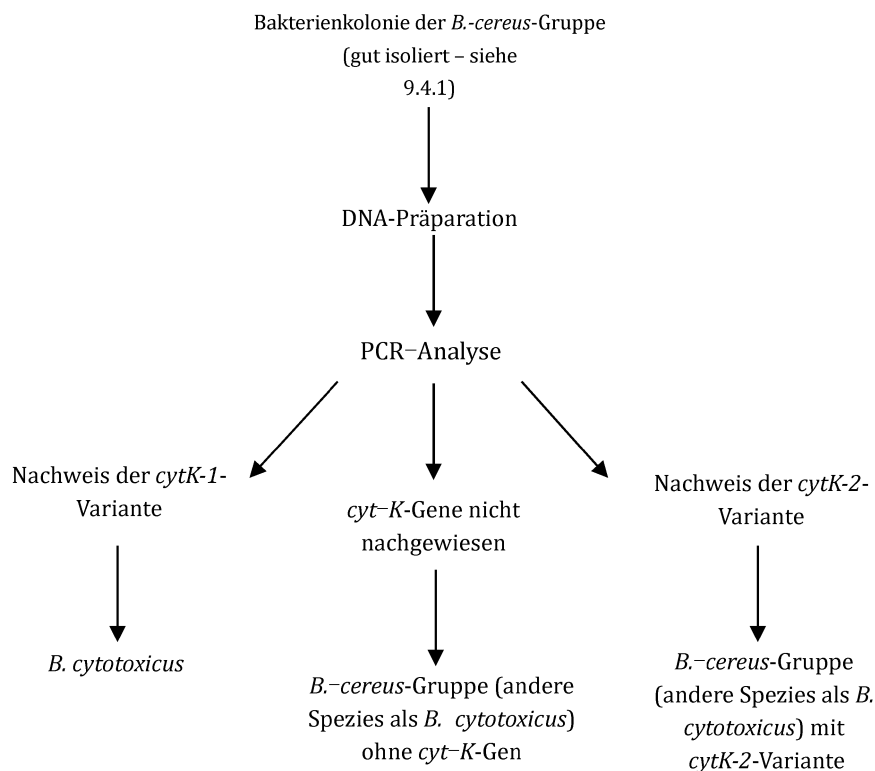


Bild 1 — Flussdiagramm für den Nachweis des Zytotoxin-K-Gens (*cytK-1*- oder *cytK-2*-Variante) mittels PCR bei Stämmen der *B.-cereus*-Gruppe und die Identifizierung von *B. cytotoxicus*

C.5.2 Nukleinsäure-Extraktion

Für die DNA-Extraktion sollten nach 9.4 bestätigte Kolonien der *B.-cereus*-Gruppe verwendet werden. Vor der DNA-Extraktion können die Bakterienkolonien optional durch Zentrifugation in 1 ml nukleasefreiem Wasser gewaschen werden. Für die Nukleinsäure-Extraktion kann jedes für diesen Zweck und für grampositive Bakterien geeignete Verfahren angewendet werden (z. B. Literaturhinweis [23]).

Mit einer 10- μ l-Impföse wird Koloniematerial (von einer MYP- oder nicht selektiven Agarplatte) abgenommen, in 1 ml nukleasefreiem Wasser suspendiert und durch Zentrifugation bei 11 000 $\times g$ für 15 min pelletiert. Das Pellet wird in 500 μ l Extraktionspuffer (Natriumdodecylsulfat 1,7 %, Tris-HCl 200 mmol/l (pH 8), EDTA 20 mmol/l, NaCl 200 mmol/l) resuspendiert. Diese Suspension wird nach Zugabe von 25 μ l Proteinase-K-Lösung (10 μ g/ μ l) für 1 h bei 55 $^{\circ}$ C inkubiert. Die DNA wird dann mit einem Volumen Phenol und anschließend mit einem Volumen Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wird mit dem 2,5-fachen Volumen gekühltes 100 %iges Ethanol präzipitiert und anschließend für 20 min bei 11 000 $\times g$ zentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen und das Pellet einmal mit 800 µl kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen wird das Pellet in 50 µl nukleasefreiem Wasser aufgelöst und bei -20 °C gelagert. Die DNA-Menge wird durch Absorptionsmessung bei 260 nm in einem Spektralphotometer quantifiziert und muss dann auf eine Konzentration eingestellt werden, die für die Empfindlichkeit der PCR geeignet ist (siehe C.6.3).

Es können auch andere Verfahren oder im Handel erhältliche gebrauchsfertige DNA-Aufreinigungskits verwendet werden, sofern gewissenhaft Kontrollen (siehe C.5.3.2) durchgeführt werden.

C.5.3 PCR-Amplifikation

C.5.3.1 Allgemeines

Das Gesamtvolumen bei der PCR beträgt 15 µl pro Reaktion. Die Reagenzien sind in Tabelle C.2 aufgeführt. Die in der Tabelle angegebenen Endkonzentrationen der Reagenzien haben sich als geeignet erwiesen.

Tabelle C.2 — Reagenzien für die PCR-Reaktion

Reagenz (Konz. Stammlösung)	Endkonzentration	Volumen je Probe (µl)
10× DNA-Polymerase-Puffer ^a	1×	1,5
dNTP-Gemisch (jeweils 5 mmol/l)	jeweils 0,2 mmol/l	0,6
CK1F (10 µmol/l)	0,25 µmol/l	0,375
CK1R (10 µmol/l)	0,25 µmol/l	0,375
CK2F (10 µmol/l)	0,25 µmol/l	0,375
CK2R (10 µmol/l)	0,25 µmol/l	0,375
MgCl ₂ (25 mmol/l)	2,5 mmol/l	1,5
DNA-Polymerase ^a	0,75 U	0,15
Genomische DNA (25 ng/µl)		2,5
Das Volumen wird mit nukleasefreiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt.		
^a Dieses Protokoll wurde unter Verwendung des im Handel erhältlichen 10-fach konzentrierten (10×) AmpliTaq®-Puffers und der AmpliTaq®-Polymerase (von Applied Biosystems, Forster City, USA) und eines Mastermix, der die vier dNTPs enthält (von Eurogentec), ¹ validiert.		

Je nach verwendeter DNA-Polymerase und je nach DNA-Präparationsverfahren können verschiedene Protokolle für die PCR-Amplifikation angewendet werden. Die PCR-Reaktion muss allerdings unter stringenten Bedingungen, mit den in Tabelle C.1 beschriebenen Primern, bei geeigneter Hybridisierungstemperatur (Tabelle C.3) und geeigneten Kontrollen (C.5.3.2) durchgeführt werden; die Zuverlässigkeit der Primer bei einer spezifischen Hybridisierungstemperatur muss zuvor validiert worden sein.

C.5.3.2 PCR-Kontrollen

Es müssen alle geeigneten Kontrollen nach ISO 22174 [13] durchgeführt werden. Mindestens eine positive und eine negative Kontrolle, die für jede Genvariante durch die DNA eines bekannten positiven bzw. eines bekannten negativen Bakterienstamms repräsentiert wird, muss bei dem PCR-Test mitgeführt werden, um die Amplifikationsbedingungen zu überprüfen.

Die DNA-Positivkontrollen (einschließlich Prozesskontrollen, wie in ISO 22174 festgelegt) sollten nach demselben Protokoll für die DNA-Extraktion gewonnen werden, das für die Prüfisolate angewendet wird.

1 Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts. Gleichwertige Produkte können eingesetzt werden, wenn nachgewiesen werden kann, dass sie zu den gleichen Ergebnissen führen.

Tabelle C.3 — Bei PCR-Tests mitzuführende Kontrollstämme

WDCM-Nummern ^a	<i>cytK-1</i>	<i>cytK-2</i>
WDCM xxxx (~~ATCC14579^T~~)	Negativkontrolle	Positivkontrolle
WDCM xxxx ~~DSM 22905^T~~	Positivkontrolle	Positivkontrolle
WDCM xxxx ~~DSM 11821~~	Negativkontrolle	Negativkontrolle
^a Für Informationen zu Stammmnummern der Kulturensammlung und Kontaktdaten ist auf den Referenzstamm-Katalog (verfügbar unter http://www.wfcc.info) Bezug zu nehmen.		

C.5.3.3 Temperatur-Zeit-Programm

Das nachfolgend dargestellte Temperatur-Zeit-Programm wurde bei der Evaluierungsstudie verwendet.

Tabelle C.4 — Temperatur-Zeit-Programm

Initiale Denaturierung		94 °C für 5 min
Amplifikation	Denaturierung	94 °C für 15 s
	Hybridisierung	57 °C für 30 s
	Elongation	72 °C für 30 s
Anzahl der Zyklen		30
Abschließende Extension		72 °C für 7 min

C.5.3.4 Nachweis des PCR-Produkts

Das PCR-Produkt wird, nach Elektrophorese in einem Agarosegel (1,5 %), mithilfe eines geeigneten Molekulargewichtsmarkers nachgewiesen (siehe ISO 20838).

C.5.4 Auswertung des PCR-Ergebnisses

Das erhaltene Ergebnis, einschließlich der oben festgelegten Kontrollen (siehe C.5.3.2), sollte wie folgt sein; andernfalls muss die PCR wiederholt werden.

Das Ergebnis der PCR ist entweder:

- positiv für die Genvariante *cytK-1*, wenn ein spezifisches PCR-Produkt von 426 bp Länge detektiert wurde und alle Kontrollen die erwarteten Ergebnisse liefern, oder
- positiv für die Genvariante *cytK-2*, wenn ein spezifisches PCR-Produkt von 585 bp Länge detektiert wurde und alle Kontrollen die erwarteten Ergebnisse liefern, oder
- negativ für die Zytotoxin-K-Gene, wenn kein spezifisches PCR-Produkt detektiert wurde und alle Kontrollen die erwarteten Ergebnisse liefern.

C.5.5 Bestätigung des PCR-Produkts

Die Spezifität dieses PCR-Verfahrens für die *cytK-1*- und *cytK-2*-Varianten betrug unter den beschriebenen PCR-Bedingungen (siehe C.6) und mit den empfohlenen Kontrollen (siehe C.5.3.2) 100 %. Nichtsdestotrotz müssen, wie in ISO 22174 [13] vorgeschrieben, die Anwesenheit des PCR-Produkts und seine Spezifität durch eine geeignete Bestätigungsreaktion nachgewiesen werden.

C.6 Leistungsmerkmale des Verfahrens

C.6.1 Allgemeines

Dieses Verfahren wurde an insgesamt 160 Stämmen der *B.-cereus*-Gruppe und zehn nicht zu dieser Gruppe gehörenden Spezies mittels der Southern-Blotting-Methode oder Sequenzierung des PCR-Produkts [23] evaluiert und anschließend auf 391 Stämme angewendet [22]. Das Testverfahren hat sich mit 0 % falsch-negativen Reaktionen und 0 % falsch-positiven Reaktionen als hochgradig zuverlässig erwiesen. Auch eine BLASTN-Analyse [25] hat ergeben, dass in den bakteriellen Organismen außer dem *cytK*-Gen keine weiteren Zielsequenzen (Targets) für die vier in die PCR-Reaktion einbezogenen Primer vorkamen. Die Spezifität für die *cytK-1*- und *cytK-2*-Varianten betrug unter den beschriebenen PCR-Bedingungen [23] und mit den empfohlenen Kontrollen (siehe C.5.3.2) 100 %.

C.6.2 Selektivität

Die Untersuchung der Selektivität wurde mittels Duplex-PCR unter Verwendung der Primer CK1F, CK1R, CK2F und CK2R, die jeweils paarweise eingesetzt wurden (CK1F/CK1R und CK2F/CK2R), durchgeführt. Dabei wurde kontrolliert, dass die Primer-Paare jeweils exklusiv mit der *cytK-1*- oder *cytK-2*-Genvariante hybridisieren und niedrig konservierte Regionen zwischen den beiden Varianten erfassen.

C.6.2.1 Inklusivitätsprüfung

Die Inklusivität des PCR-Testverfahrens für das *cytK-2*-Fragment wurde an 66 Zielstämmen geprüft. Dabei wurde eine Inklusivität von 100 % erhalten. Die Inklusivität des PCR-Testverfahrens für das *cytK-1*-Fragment wurde an fünf Zielstämmen geprüft. Dabei wurde ebenfalls eine Inklusivität von 100 % erhalten. Bei den auf die *cytK-2*-Genvariante getesteten Stämmen handelte es sich um *B. cereus* sensu stricto und *B. thuringiensis*-Stämme (die beiden Spezies, die Träger des *cytK-2*-Gens sein können [22]). Die Zielstämme für *cytK-1* entsprechen allen fünf *B. cytotoxicus*-Stämmen, die zum Zeitpunkt der Evaluierung verfügbar waren. Sie waren ausreichend unterschiedlich von den übrigen Spezies der Gruppe, um einen bestimmten Polymorphismus zeigen zu können, der zur *cytK-1*-Variante des *cytK*-Gens führt.

C.6.2.2 Exklusivitätsprüfung

Die Exklusivität des Testverfahrens für das *cytK-1*-Fragment wurde an 157 Nicht-Zielstämmen geprüft. Dabei wurde eine Exklusivität von 100 % erhalten. Die Exklusivität des Testverfahrens für das *cytK-2*-Fragment wurde an 94 Nicht-Zielstämmen geprüft. Dabei wurde ebenfalls eine Exklusivität von 100 % erhalten.

Die getesteten Stämme wurden aus allen Spezies der *B.-cereus*-Gruppe sowie acht verschiedenen lebensmittelrelevanten Spezies gewonnen.

C.6.3 Sensitivität

Die Grenzen für die PCR-Amplifikation lagen zwischen 15 ng und 75 ng genomischer DNA pro 15 µl endgültiges Reaktionsvolumen.

C.7 Einschränkungen des PCR-Testverfahrens

Dieses PCR-Testverfahren ermöglicht es, i) das Zytotoxin-K-Gen (und im Besonderen eine seiner beiden Varianten) nachzuweisen und ii) *B. cytotoxicus*-Stämme zu identifizieren – zwei Merkmale, die mit einer Lebensmittelvergiftung in Zusammenhang stehen. Auch wenn dies auf ein potenzielles Risiko hindeutet, so ermöglicht das Vorhandensein des Gens oder die Spezies-Identifikation allein noch nicht die Bestätigung der *cytK*-Genexpression.

Anhang D (informativ)

Verfahren für den molekularen Nachweis von Cereulid-produzierenden Stämmen der *Bacillus-cereus*-Gruppe

D.1 Gelbasiertes PCR-Testverfahren für den Nachweis des *ces*-Gens der Cereulid- produzierenden Stämme der *Bacillus-cereus*-Gruppe

D.1.1 Einleitung

In diesem Anhang wird ein Verfahren für die Amplifikation und den Nachweis des spezifisch für die Produktion von Cereulid verantwortlichen *ces*-Gens in Stämmen der *Bacillus-cereus*-Gruppe beschrieben. Das Verfahren basiert auf einer Agarosegel-Elektrophorese.

D.1.2 Kurzbeschreibung

Spezifische DNA-Fragmente des *ces*-Gens werden unter Verwendung von zwei Primern mittels PCR amplifiziert. Der Nachweis des PCR-Produkts erfolgt durch Agarosegel-Elektrophorese.

D.1.3 Reagenzien

D.1.3.1 Allgemeines

Alle Reagenzien, die für das in diesem Anhang beschriebene Verfahren benötigt werden, weisen einen für die Molekularbiologie geeigneten Reinheitsgrad auf; dies gilt auch für sämtliche Verbrauchsmaterialien. Sie müssen wie in ISO 20837 und ISO 20838 festgelegt verwendet werden.

D.1.3.2 Reagenzien für die Nukleinsäure-Extraktion

Das Verfahren der Nukleinsäure-Extraktion und die verwendeten Reagenzien müssen für grampositive Bakterien geeignet sein. Es können auch im Handel erhältliche Reagenzien-Kits verwendet werden.

D.1.3.3 Reagenzien für die PCR

D.1.3.3.1 PCR-Pufferlösung

Die 10-fach konzentrierte PCR-Pufferlösung gehört üblicherweise zum Lieferumfang der DNA-Polymerase; in ihr kann MgCl_2 in einer vom Hersteller angegebenen Konzentration enthalten sein oder nicht. Die Endkonzentrationen an MgCl_2 sind verfahrensspezifisch und werden daher in Tabelle D.2 aufgeführt. Möglicherweise sind gebrauchsfertige Reagenzien im Handel erhältlich. Die Gebrauchsanleitung des Herstellers sollte beachtet werden.

D.1.3.3.2 MgCl_2 -Lösung, $c(\text{MgCl}_2) = 25 \text{ mmol/l}$.

D.1.3.3.3 Thermostabile DNA-Polymerase (für Heißstart-PCR geeignet), $5 \text{ IU}/\mu\text{l}$.

D.1.3.3.4 dNTP-Lösung, $c(\text{dNTP}) = 10 \text{ mmol/l}$, bezogen auf das Gemisch.

D.1.3.3.5 Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Tabelle D.1 aufgeführt.

Tabelle D.1 — Sequenzen der Oligonukleotide

Gen	Primer	Sequenz (5' — 3')	Größe des Amplikons (bp)
<i>ces</i>	EM1F	GAC AAG AGA AAT TTC TAC GAG CAA GTA CAA T	635
	EM1R	GCA GCC TTC CAA TTAC TCC TTC TGC CAC AGT	

D.1.3.4 Reagenzien für die Gelelektrophorese

Siehe ISO 20838 [11].

D.1.4 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

D.1.4.1 Allgemeines

Für das Verfahren geeignete Ausrüstung, und insbesondere Folgendes:

D.1.4.2 Ausrüstung für die Nukleinsäure-Extraktion

D.1.4.2.1 Mikrozentrifugenröhrchen, mit einem Nennvolumen von 1,5 ml und 2,0 ml.

D.1.4.2.2 Zentrifuge, für Reaktionsröhrchen mit einem Nennvolumen von 1,5 ml und 2,0 ml und mit der Fähigkeit, Beschleunigungswerte von bis zu $14\,000 \times g$ zu erreichen.

D.1.4.2.3 Thermoblock, mit einer Heizleistung von bis zu 100 °C.

D.1.4.2.4 Graduierte Pipetten und Filter-Pipettenspitzen, für Volumina zwischen 1 µl und 1 000 µl.

D.1.4.2.5 Mischer

D.1.4.3 Ausrüstung für die PCR

D.1.4.3.1 Pipetten und Filter-Pipettenspitzen, mit Nennvolumina zwischen 1 µl und 1 000 µl.

D.1.4.3.2 Mikrozentrifugenröhrchen, mit einem Nennvolumen von 1,5 ml und 2,0 ml.

D.1.4.3.3 Dünnwandige PCR-Mikroröhrchen, 0,2-ml- oder 0,5-ml-Reaktionsröhrchen, PCR-Mikroplatten mit mehreren Vertiefungen (Multi-Well-Platten) oder andere geeignete Ausrüstung.

D.1.4.3.4 Thermocycler.

D.1.4.4 Ausrüstung für den Nachweis des PCR-Produkts

D.1.4.4.1 Mikrowellenofen oder siedendes Wasserbad.

D.1.4.4.2 Horizontal-Gelsystem.

D.1.4.4.3 Stromversorgung.

D.1.4.4.4 UV-Transilluminator oder UV-Lichtkasten.

D.1.4.4.5 Geldokumentationssystem.

D.1.5 Durchführung

D.1.5.1 Nukleinsäure-Extraktion

Für die DNA-Extraktion sollten nach 9.4 bestätigte Kolonien der *B.-cereus*-Gruppe verwendet werden. Vor der DNA-Extraktion können die Bakterienkolonien optional durch Zentrifugation in 1 ml nukleasefreiem Wasser gewaschen werden. Für die Nukleinsäure-Extraktion kann jedes für diesen Zweck und für grampositive Bakterien geeignete Verfahren angewendet werden (siehe z. B. Literaturhinweis [15]).

D.1.5.2 PCR-Konfiguration

Das hier beschriebene Verfahren gilt für ein Gesamtvolumen bei der PCR von 50 µl pro Reaktion mit den in Tabelle D.2 aufgeführten Reagenzien. Die PCR kann auch in einem kleineren Reaktionsvolumen durchgeführt werden, sofern die Volumina der Lösungen entsprechend angepasst werden. Die in der Tabelle D.2 angegebenen Endkonzentrationen der Reagenzien haben sich als geeignet erwiesen.

Tabelle D.2 — Zugabe der Reagenzien

Reagenz	Endkonzentration	Volumen je Probe µl
Template-DNA		1
nukleasefreies Wasser		24,7
PCR-Puffer, 10× (ohne MgCl ₂) ^a		5
MgCl ₂ -Lösung, <i>c</i> (MgCl ₂) = 25 mmol/l	150 µmol/l	0,3
dNTP-Lösung, <i>c</i> (dNTP) = 10 mmol/l	800 µmol/l	4
PCR-Primer (EM1F und EM1R, nach Tabelle D.1), 5 µmol/l	jeweils 0,5 µmol/l	5
Thermostabile DNA-Polymerase, 5 IU/µl	0,5 IU	5
^a Wenn die PCR-Pufferlösung bereits MgCl ₂ enthält, wird die Endkonzentration an MgCl ₂ im Reaktionsgemisch auf 4,8 mmol/l eingestellt.		

D.1.5.3 PCR-Kontrollen

Es müssen alle geeigneten Kontrollen nach ISO 22174 [13] durchgeführt werden.

Der folgende Stamm kann als Positivkontrolle verwendet werden:

Bacillus cereus, emetischer Stamm WDCM xxxx ~~DSM 4312~~

D.1.5.4 Temperatur-Zeit-Programm

Das in Tabelle D.3 dargestellte Temperatur-Zeit-Programm und der nach Tabelle D.3 angesetzte Mastermix wurden in der Validierungsstudie [16] verwendet. Bei Verwendung eines anderen Thermocyclers ist gegebenenfalls die Anpassung der PCR-Bedingungen erforderlich. Die Zeit für die Aktivierung bzw. initiale Denaturierung hängt von der verwendeten Polymerase ab. Die Empfehlung des Herstellers der DNA-Polymerase ist zu befolgen.

Tabelle D.3 — Temperatur-Zeit-Programm

Aktivierung/initiale Denaturierung	95 °C für 15 min
Amplifikation	95 °C für 30 s
	59 °C für 30 s
	72 °C für 60 s
Anzahl der Zyklen (Amplifikation)	30
Abschließende Extension	72 °C für 5 min

D.1.5.5 Nachweis der PCR-Produkte

D.1.5.5.1 Gelelektrophorese

Siehe ISO 20838 [11].

D.1.5.5.2 Geldokumentation

Das Gel wird auf die Oberfläche des Transilluminators überführt, und nach Einschalten der UV-Lichtquelle wird die DNA-Fluoreszenz durch fotografische oder Videoaufnahme dokumentiert.

Tabelle D.4 — Größe der Amplifikationsprodukte

Gen	Primer	Größe des Produkts (bp)
<i>ces</i>	EM1F/EM1R	635

Die Zielsequenzen gelten als nachgewiesen, wenn die Größe des PCR-Produkts der erwarteten Länge der jeweiligen Ziel-DNA-Sequenz entspricht. Hinsichtlich der Auswertung der Ergebnisse siehe ISO 22174 [13].

D.1.5.6 Bestätigung eines positiven PCR-Ergebnisses

Ein positives PCR-Ergebnis muss bestätigt werden, z. B. durch die Sequenzierung der PCR-Produkte. Auch andere geeignete Verfahren zur Bestätigung können angewendet werden.

D.1.6 Leistungsmerkmale des Verfahrens

D.1.6.1 Allgemeines

Das Verfahren ist für DNA validiert worden, die aus verschiedenen emetischen Stämmen der *Bacillus-cereus*-Gruppe extrahiert wurde (siehe [9]).

D.1.6.2 Theoretische Bewertung des Verfahrens

Die theoretische Bewertung erfolgte anhand einer Abfrage der GenBank-/EMBL-/DDBJ-Datenbank auf Sequenzähnlichkeit (NCBI-Blast®-Abfrage der EMBL-Datenbank; 22. September 2015). Das Ergebnis der Datenbank-Abfrage bestätigte die vollständige Übereinstimmung (Identität) der Primer nur mit der erwarteten Zielsequenz.

D.1.6.3 Selektivität

D.1.6.4 Inklusivitätsprüfung

Die Inklusivität des Verfahrens wurde an 30 emetischen Stämmen der *Bacillus-cereus*-Gruppe geprüft, siehe Tabelle D.5.

Tabelle D.5 — Inklusivität der PCR durch Verwendung von Zielstämmen

Quelle	Anzahl an Stämmen	ces-Gen nachgewiesen
Lebensmittelstämme (ohne Zusammenhang mit bzw. Ausbruch einer lebensmittelbedingten Erkrankung)	5	5
Lebensmittelstämme im Zusammenhang mit einer lebensmittelbedingten Erkrankung	13	13
Humanproben (Erbrochenes, Stuhl)	12	12

D.1.6.5 Exklusivitätsprüfung

Die Exklusivität des Verfahrens wurde an 178 Nicht-Zielorganismen geprüft, siehe Tabelle D.6. Für die Nicht-Zielbakterien wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet.

Tabelle D.6 — Exklusivität der PCR durch Verwendung von Nicht-Zielstämmen

Spezies	Anzahl an Stämmen	ces-Gen nachgewiesen
<i>Bacillus cereus</i> , nicht-emetische Stämme	100	0
<i>Bacillus anthracis</i>	7	0
<i>Bacillus mycoides</i>	6	0
<i>Bacillus thuringiensis</i>	6	0
<i>Bacillus pseudomyoides</i>	3	0
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	7	0
andere <i>Bacillus</i> spp.	8	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	0
<i>Staphylococcus equorum</i>	1	0
<i>Clostridium perfringens</i>	3	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	6	0
<i>Campylobacter</i> spp.	3	0
<i>Escherichia coli</i>	4	0
<i>Salmonella</i> spp.	6	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	8	0

D.2 PCR-Testverfahren für den Nachweis des *ces*-Gens bei Cereulid-produzierenden Stämmen der *Bacillus-cereus*-Gruppe mittels Realtime-PCR

D.2.1 Einleitung

In diesem Anhang wird ein sondenbasiertes Echtzeit-PCR-Verfahren (Realtime-PCR) mit Anwendung der TaqMan Technologie beschrieben. Es dient dem Nachweis des *ces*-Gens, das für die emetischen Stämme der *Bacillus-cereus*-Gruppe spezifisch ist.

D.2.2 Kurzbeschreibung

Ein bestimmtes DNA-Fragment des *ces*-Gens, das für emetische Stämme der *Bacillus-cereus*-Gruppe spezifisch ist, wird mittels Realtime-PCR amplifiziert. Das PCR-Produkt wird durch Messung der Fluoreszenz der verwendeten Sonde nachgewiesen.

D.2.3 Reagenzien

D.2.3.1 Allgemeines

Hinsichtlich der Qualität der verwendeten Reagenzien siehe ISO 22174 [13] und ISO 22119 [12].

D.2.3.2 Reagenzien für die Nukleinsäure-Extraktion

Alle Reagenzien, die für das in diesem Anhang beschriebene Verfahren benötigt werden, weisen einen für die Molekularbiologie geeigneten Reinheitsgrad auf; dies gilt auch für sämtliche Verbrauchsmaterialien. Sie müssen wie in ISO 20837 [10] und ISO 20838 [11] festgelegt verwendet werden.

D.2.3.3 Gebrauchsfertiger Mastermix für die Realtime-PCR

Ein gebrauchsfertiger Mastermix enthält PCR-Pufferlösung, MgCl₂-Lösung, dNTP-Lösung sowie optional ein Dekontaminationssystem (dUTP-Einbau mit Uracil-N-Glycosylase) und die Taq-Polymerase; ein solcher Master-Mix wird zumeist an den verwendeten Thermocycler angepasst. Die Gebrauchsanleitung des Herstellers sollte beachtet werden.

D.2.3.4 Plasmid pUC19

Das Plasmid wird als interne Amplifikationskontrolle (Internal Amplification Control, IAC) eingesetzt.

D.2.3.5 Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in Tabelle D.7 aufgeführt.

Tabelle D.7 — Sequenzen der Oligonukleotide

Gen	Primer/Sonde	Sequenz (5' → 3')
<i>ces</i>	ces_TaqMan_for	CGC CGA AAG TGA TTA TAC CAA
	ces_TaqMan_re	TAT GCC CCG TTC TCA AAC TG
	ces_TaqMan_probe	FAM ^a -GGGAAAATAACGAGAAATGCA-TAMRA ^b
Interne Amplifikationskontrolle (IAC) [9]	IAC_for	TGT GAA ATA CCG CAC AGA TG
	IAC_re	AGC TGG CGT AAT AGC GAA G
	IAC_probe	HEX ^c -GAG AAA ATA CCG CAT CAG GC-TAMRA ^b
^a FAM: 6-Carboxyfluorescein ^b TAMRA: 6-Carboxytetramethylrhodamin ^c HEX: 5'-Hexachlor-Fluorescein		

ANMERKUNG Die Verwendung anderer Fluoreszenzmarker für die Sonden wurde nicht geprüft oder validiert.

D.2.4 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

D.2.4.1 Allgemeines

Für das Verfahren geeignete Ausrüstung, und insbesondere Folgendes:

D.2.4.2 Ausrüstung für die Nukleinsäure-Extraktion

D.2.4.2.1 Ausrüstung für die PCR

D.2.4.2.2 Pipetten und Filter-Pipettenspitzen, mit Nennvolumina zwischen 1 µl und 1 000 µl.

D.2.4.2.3 Mikrozentrifugenröhrchen, mit einem Nennvolumen von 1,5 ml und 2,0 ml.

D.2.4.2.4 Dünnwandige PCR-Mikroröhrchen, 0,2-ml- oder 0,5-ml-Reaktionsröhrchen, PCR-Mikroplatten mit mehreren Vertiefungen (Multi-Well-Platten) oder andere geeignete Ausrüstung.

D.2.4.2.5 Realtime-PCR-Gerät

D.2.5 Durchführung

D.2.5.1 Nukleinsäure-Extraktion

Für die DNA-Extraktion sollten nach 9.4 bestätigte Kolonien der *B.-cereus*-Gruppe verwendet werden. Vor der DNA-Extraktion können die Bakterienkolonien optional durch Zentrifugation in 1 ml nukleasefreiem Wasser gewaschen werden. Für die Nukleinsäure-Extraktion kann jedes für diesen Zweck und für grampositive Bakterien geeignete Verfahren angewendet werden (siehe z. B. Literaturhinweis [15]).

D.2.5.2 PCR-Konfiguration

Das hier beschriebene Verfahren gilt für ein Gesamtvolumen bei der PCR von 25 µl pro Reaktion mit den in Tabelle D.8 aufgeführten Reagenzien. Die PCR kann auch in einem größeren Reaktionsvolumen durchgeführt werden, sofern die Volumina der Lösungen entsprechend angepasst werden. Die in der Tabelle D.8 angegebenen Endkonzentrationen der Reagenzien haben sich als geeignet erwiesen.

Tabelle D.8 — Zugabe der Reagenzien

Reagenz		Endkonzentration	Volumen je Probe (µl)
Template-DNA		maximal 250 ng	5
TaqMan DNA-Polymerase	Brilliant QPCR Multiplex MasterMix ² (Fußnote 9 neu nummerieren)	1×	12,5
PCR-Puffer			
MgCl ₂ -Lösung			
dNTP-Lösung			
PCR-Primer (ces_TaqMan_for und ces_TaqMan_re, IAC_for und IAC_re, nach Tabelle D.7), 10 µmol/l		jeweils 500 µmol/l	1,25
PCR-Sonden (ces_TaqMan_probe und IAC_probe, nach Tabelle D.7), 10 µmol/l		jeweils 200 µmol/l	0,5
Nukleasefreies Wasser			0,5
Plasmid pUC19, 1 fg			1 µl

2 Brilliant QPCR Multiplex MasterMix ist ein Beispiel für ein geeignetes Produkt, das im Handel von Agilent Technologies bezogen werden kann. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Internationalen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen eingesetzt werden, wenn nachgewiesen werden kann, dass sie zu den gleichen Ergebnissen führen.