DIN EN ISO 6579-4:2025-06 (D)

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen - Teil 4: Identifizierung von monophasischen Salmonella Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (ISO 6579-4:2025); Deutsche Fassung EN ISO 6579-4:2025

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort 8
Vorwort 9
Einleitung 10
1 Anwendungsbereich 11
2 Normative Verweisungen 11
3 Begriffe 12
4 Kurzbeschreibung 12
4.1 Allgemeines 12
4.2 Vorbereitung von eindeutig voneinander getrennten Kolonien 12
4.3 Suspension der Kolonie 13
4.4 Amplifikation und Nachweis 13
5 Nährmedien und Reagenzien 13
6 Geräte und Verbrauchsmaterialien 13
7 Präsumtiv monophasische *Salmonella* Typhimurium 14
8 Kultivierung des Isolats 14
9 Durchführung 14
9.1 Anfertigung von Zellsuspension oder DNA 14
9.2 PCR-Amplifikation und Nachweis 14
9.2.1 Allgemeines 14
9.2.2 PCR-Kontrollen 15
10 Angabe der Ergebnisse 15
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens 15
11.1 Validierung nach ISO 17468 15
11.2 Leistungsmerkmale 15
11.2.1 Studie zur Verfahrensbewertung 15
11.2.2 Ringversuch 16
12 Untersuchungsbericht 16
13 Qualitätssicherung 17
Anhang A (normativ) Nährmedien und Reagenzien 18
A.1 Allgemeines 18
A.2 Nähragar (Beispiel für ein nicht selektives Agar-Medium) 18
A.2.1 Zusammensetzung 18
A.2.2 Herstellung 18
A.2.3 Herstellung der Nähragarplatten 19
A.3 Kochsalzlösung (0,85 % m/v) 19
A.3.1 Zusammensetzung 19
A.3.2 Herstellung 19

A.4 Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien 19

Anhang B (informativ) Sondenbasierter Multiplex-Real-time-PCR-Assay zur Identifizierung von monophasischem *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-) 21
B.1 Allgemeines 21
B.2 Durchführung 21
B.2.1 Kurzbeschreibung 21
B.2.2 PCR-Reagenzien 21
B.2.3 Real-time-PCR-Aufbau 22
B.3 Auswertung der PCR-Ergebnisse 24

Anhang C (informativ) Agarosegel-basierter Multiplex-PCR-Assay zur Identifizierung von monophasischem *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-) 26
C.1 Allgemeines 26
C.2 Durchführung 26
C.2.1 Kurzbeschreibung 26
C.2.2 PCR-Reagenzien 26
C.2.3 Multiplex-PCR-Aufbau 27
C.2.4 Agarosegel-Elektrophorese 28
C.3 Auswertung der PCR-Ergebnisse 31

Anhang D (informativ) Agarosegel-basierter Einzelziel-PCR-Assay zur Identifizierung von monophasischem *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-) 32
D.1 Allgemeines 32
D.2 Durchführung 32
D.2.1 Kurzbeschreibung 32
D.2.2 PCR-Reagenzien 32
D.2.3 Einzelziel-PCR-Aufbau 33
D.2.4 Agarosegel-Elektrophorese 36
D.3 Auswertung der PCR-Ergebnisse 38

Anhang E (informativ) Leistungsmerkmale 40
E.1 Studie zur Verfahrensbewertung 40
E.2 Ringversuch 44
E.2.1 Allgemeines 44
E.2.2 Ergebnisse der Multiplex-Real-time-PCR 45
E.2.3 Ergebnisse der gelbasierten Multiplex-PCR 45
E.2.4 Ergebnisse der gelbasierten Einzelziel-PCR 46
E.2.5 Leistungsmerkmale des Ringversuchs 46

Literaturhinweise 48

Tabellen

Tabelle A.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien 19

Tabelle B.1 — Sequenzen der Primer und Sonden 22

Tabelle B.2 — Herstellung der Reaktionsmischung 22

Tabelle B.3 — Temperatur-Zeit-Programm 24

Tabelle B.4 — Auswertung der PCR-Ergebnisse 25

Tabelle C.1 — Sequenzen der Primer 27

Tabelle C.2 — Herstellung der Reaktionsmischung 27

Tabelle C.3 — Temperatur-Zeit-Programm 28

Tabelle C.4 — Auswertung der PCR-Ergebnisse (erwartete Fragmentgrößen in bp) 31

Tabelle D.1 — Sequenzen der Primer 33

Tabelle D.2 — Herstellung der Reaktionsmischung für die Zielsequenz *fliA*-IS*200*..... 33

Tabelle D.3 — Herstellung der Reaktionsmischung für die Zielsequenz *fljB-hin* 34

Tabelle D.4 — Herstellung der Reaktionsmischung für die Zielsequenz *hin-iroB*..... 34

Tabelle D.5 — Temperatur-Zeit-Programm..... 35

Tabelle D.6 — Auswertung der PCR-Ergebnisse (erwartete Fragmentgröße in bp) 39

Tabelle E.1 — Ergebnisse zur Inklusivität und Exklusivität der Studie zur Verfahrensbewertung, bei der drei PCR-Assays in zwei Laboren durchgeführt wurden, in der sowohl monophasisches *Salmonella* Typhimurium (mSTm) als auch (biphasisches) *Salmonella* Typhimurium (STm) als Zielstämme und andere *Salmonella*-Serovare sowie andere *Enterobacteriaceae* als Nicht-Zielstämme betrachtet wurden..... 42

Tabelle E.2 — Ergebnisse zur Inklusivität und Exklusivität der Studie zur Verfahrensbewertung, in der drei PCR-Assays in zwei Laboren durchgeführt und monophasisches *Salmonella* Typhimurium (mSTm) als Zielstamm und (biphasisches) *Salmonella* Typhimurium (STm) sowie andere *Salmonella*-Serovare und andere *Enterobacteriaceae* als Nicht-Zielstämme betrachtet wurden..... 42

Tabelle E.3 — Einzelheiten über den Ringversuch der drei PCR-Assays..... 46

Tabelle E.4 — Ergebnisse zur Inklusivität und Exklusivität des mit den drei PCR-Assays durchgeführten Ringversuchs, in dem monophasisches *Salmonella* Typhimurium als Zielstamm und (biphasisches) *Salmonella* Typhimurium, andere *Salmonella*-Serovare sowie andere *Enterobacteriaceae* als Nicht-Zielstämme betrachtet wurden..... 47