

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 <i>Salmonella</i> 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 <i>Salmonella</i> Typhimurium (1,4[5],12:i:-)		
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 <i>Salmonella</i> Typhimurium (1,4[5],12:i:-)		
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 <i>Salmonella</i> Typhimurium (1,4[5],12:i:-)		
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		
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 <i>fliA-IS200</i>.....	33
Tabelle D.3 — Herstellung der Reaktionsmischung für die Zielsequenz <i>fljB-hin</i>	34
Tabelle D.4 — Herstellung der Reaktionsmischung für die Zielsequenz <i>hin-iroB</i>.....	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 <i>Salmonella</i> Typhimurium (mSTm) als auch (biphasisches) <i>Salmonella</i> Typhimurium (STm) als Zielstämme und andere <i>Salmonella</i>-Serovare sowie andere <i>Enterobacteriaceae</i> 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 <i>Salmonella</i> Typhimurium (mSTm) als Zielstamm und (biphasisches) <i>Salmonella</i> Typhimurium (STm) sowie andere <i>Salmonella</i>-Serovare und andere <i>Enterobacteriaceae</i> 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 <i>Salmonella</i> Typhimurium als Zielstamm und (biphasisches) <i>Salmonella</i> Typhimurium, andere <i>Salmonella</i>-Serovare sowie andere <i>Enterobacteriaceae</i> als Nicht-Zielstämme betrachtet wurden.....	47