E DIN EN ISO 6579-4:2024-01 (D/E)

Erscheinungsdatum: 2023-12-15

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonella spp. - Teil 4: Identifizierung von monophasischen Salmonella Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (ISO/DIS 6579-4:2023); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 6579-4:2023

Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 4: Identification of monophasic Salmonella Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) by polymerase chain reaction (PCR) (ISO/DIS 6579-4:2023); German and English version prEN ISO 6579-4:2023

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort 8

Vorwort 9

Einleitung 10

1 Anwendungsbereich 11

2 Normative Verweisungen 11

3 Begriffe 12

4 Kurzbeschreibung 13
4.1 Allgemeines 13
4.2 Vorbereitung von gut voneinander getrennten Kolonien 13
4.3 Suspension der Kolonie 13
4.4 Amplifikation und Nachweis 13

5 Nährmedien und Reagenzien 13

6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien 13

7 Präsumtiver monophasischer Stamm von *Salmonella* Typhimurium (Isolat) 14

8 Kultivierung des Isolats 14

9 Durchführung 14
9.1 Anfertigung von Zellsuspension oder DNS 14
9.2 PCR-Amplifikation und Nachweis 15
9.2.1 Allgemeines 15
9.2.2 PCR-Kontrollen 15

10 Darstellung der Ergebnisse 15

11 Leistungsmerkmale des Verfahrens 16
11.1 Validierung nach ISO 17468 16
11.2 Leistungsmerkmale 16
11.2.1 Studie zur Verfahrensbewertung 16
11.2.2 Ringversuch 16

12 Prüfbericht 17

13 Qualitätssicherung 17

Anhang A (informativ) Nährmedien und Reagenzien 18
A.1 Allgemeines 18
A.2 Nähragar (Beispiel für ein nicht selektives Medium) 18
A.2.1 Zusammensetzung 18

A.2.2 Herstellung ... 18
A.2.3 Herstellung der Nähragarplatten ... 19
A.3 Kochsalzlösung (0,85 % w/v) ... 19
A.3.1 Zusammensetzung ... 19
A.3.2 Herstellung ... 19
A.4 Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien ... 19

Anhang B (informativ) Probenbasierter Multiplex-Real-time-PCR-Test 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 Reagenzien für PCR ... 21
B.2.3 Aufbau von Real-time-PCR ... 22
B.3 Auswertung der PCR-Ergebnisse ... 24

Anhang C (informativ) Agarosegel-basierter Multiplex-Real-time-PCR-Test 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 Reagenzien für PCR ... 26
C.2.3 Multiplex-PCR-Aufbau ... 27
C.2.4 Agarosegel-Elektrophorese ... 28
C.3 Auswertung der PCR-Ergebnisse ... 30

Anhang D (informativ) Agarosegel-basierter Einzelziel-PCR-Test 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 Reagenzien für PCR ... 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 ... 42
E.2.1 Allgemeines ... 42
E.2.2 Ergebnisse der Multiplex-Real-time-PCR ... 43
E.2.3 Ergebnisse der gelbasierten Multiplex-PCR ... 44
E.2.4 Ergebnisse der gelbasierten Einzelziel-PCR ... 44
E.2.5 Leistungsmerkmale des Ringversuchs ... 44

Literaturhinweise ... 47

Tabellen

Tabelle A.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien ... 20

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 Fragmentgröße 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-iro*B 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-Tests 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 41

Tabelle E.2 — Ergebnisse zur Inklusivität und Exklusivität der Studie zur Verfahrensbewertung, in der drei PCR-Tests 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 41

Tabelle E.3 — Einzelheiten über den Ringversuch der drei PCR-Tests 45

Tabelle E.4 — Ergebnisse zur Inklusivität und Exklusivität des mit den drei PCR-Tests durchgeführten Ringversuchs, in dem monophasisches *Salmonella* Typhimurium als Zielstamm und (biphasisches) *Salmonella* Typhimurium, andere *Salmonella*-Serovare sowie andere *Enterobacteriaceae* als Nicht-Zielstämme betrachtet wurden 46