

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 <i>Salmonella</i> 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 <i>Salmonella</i> 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 <i>Salmonella</i> 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 <i>Salmonella</i> 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 <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-Tests 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	41
Tabelle E.2 — Ergebnisse zur Inklusivität und Exklusivität der Studie zur Verfahrensbewertung, in der drei PCR-Tests 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.....	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 <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.....	46