

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 |