

Verfahren zum Nachweis von Salmonellen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DIN
10135

ICS 07.100.30

Method for detection of salmonella with polymerase chain reaction (PCR)

Méthode de recherche des salmonella par la réaction en chaîne polymérase (PCR)

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte, Arbeitsausschuß „Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von Mikroorganismen“, erarbeitet.

Diese Norm kann Schutzrechte berühren: Auskünfte erteilt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin).

Die Anhänge A bis C sind informativ.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in Lebens- und Futtermitteln und aus diesen gewonnenen Isolaten mit der Polymerase-Kettenreaktion fest.

ANMERKUNG: Diese Norm kann auch für andere Fragestellungen im Lebensmittelbereich angewendet werden, z. B. für Umgebungsuntersuchungen.

L00.00-20

Untersuchung von Lebensmitteln – Nachweis von Salmonellen. In: Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG; Verfahren zur Probenahme und Untersuchung von Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen/BgVV. Loseblattsammlung, Stand Jan. 1997 Bd. 1/1, (Beuth Verlag GmbH, Berlin, Köln)

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

DIN 10134 : 1998-11

Allgemeine verfahrensspezifische Anforderungen zum Nachweis von Mikroorganismen mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Lebensmitteln

DIN 58967-60 : 1995-01

Serodiagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten – Teil 60: Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Begriffe, Allgemeine methodenspezifische Anforderungen

ISO 6579:1993

Microbiology – General guidance on methods for the detection of Salmonella

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die allgemeinen PCR-methodenspezifischen Begriffe nach DIN 58967-60 und DIN 10134 und darüber hinaus die folgenden:

3.1 Salmonellen

Gram-negative Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Die Gattung *Salmonella* umfaßt die beiden Arten *Salmonella enterica*, mit sechs bekannten Unterarten, und *Salmonella bongori*.

3.2 Salmonellen-spezifische DNA-Sequenzen

Genombereiche, die für den spezifischen Nachweis von Salmonellen im Rahmen dieser Norm geeignet sind.

3.3 PCR-ELISA; PCR-Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay

Ein Nachweisverfahren, bei dem Amplifikate an einer Festphase (z. B. in Mikrotiterplatten) durch immunochemische Detektion nachgewiesen werden.

Fortsetzung Seite 2 bis 8

Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

4 Formelzeichen und Abkürzungen

4.1 Formelzeichen

c	Stoffmengenkonzentration;
g	$9,81 \text{ ms}^{-2}$;
ω	Massenanteil;
β	Massenkonzentration;
φ	Volumenanteil;
U	Einheit (en: unit) einer Enzymaktivität, die bei einer definierten Temperatur eine vorgegebene Substratmenge je Zeiteinheit umsetzt. Sie ist hersteller- und produktspezifisch festgelegt.

4.2 Abkürzungen

Anti-DIG	Anti-Digoxigenin-Antikörper;
BSA	Bovines Serum Albumin;
DNA	Desoxyribonukleinsäure (en: deoxyribonucleic acid);
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate;
dsDNA	Doppelstrang-DNA;
Na_2EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$;
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay;
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (en: phosphate-buffered-saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (en: polymerase chain reaction);
POD	Peroxidase;
SSC	Standard Saline Citrat;
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> ;
T_m	Schmelzpunkttemperatur;
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin;
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid.

5 Prinzip des Verfahrens

5.1 Allgemeines

Die Untersuchung gliedert sich in vier aufeinanderfolgende Schritte:

- nichtselektive und/oder selektive Anreicherung (siehe 5.2);
- Nukleinsäureextraktion (siehe 5.3);
- Amplifikation der gesuchten Nukleinsäuresequenz mittels spezifischer Primer in der PCR (siehe 5.4) und
- Detektion spezifischer Amplifikate (siehe 5.5).

Um eine PCR-Inhibition durch die Matrix zu erfassen, muß eine Kontroll-DNA in der gleichen Matrix amplifiziert werden (Amplifikationskontrolle, siehe Anhang A). Die Detektion der spezifischen Amplifikate kann mit verschiedenen Verfahren vorgenommen werden (siehe 5.5 von DIN 10134 : 1998-11).

5.2 Mikrobielle Anreicherung

Die Proben werden in einem flüssigen nichtselektiven und/oder selektiven Nährmedium bebrütet. Dabei muß sichergestellt sein, daß mit den gewählten Bedingungen ein PCR-Nachweis von Salmonellen geführt werden kann. Die Sensitivität muß mindestens der kultureller Verfahren (z. B. L00.00-20 oder ISO 6579 : 1993) entsprechen.

5.3 Nukleinsäureextraktion

Aus einer bestimmten Menge der mikrobiellen Anreicherung werden die Mikroorganismen separiert, die Zellen aufgeschlossen und anschließend die Nukleinsäure extrahiert und gegebenenfalls zur Vermeidung PCR-inhibitorischer Effekte gereinigt.

5.4 Amplifikation mittels PCR

Ein festgelegtes Volumen an extrahierter Nukleinsäure wird zu einem PCR-Ansatz gegeben und die Amplifikation in einem Gerät nach 7.4.3 durchgeführt.

5.5 Detektion spezifischer Amplifikate

Die Detektion spezifischer Amplifikate kann mit jedem der in 5.5 von DIN 10134 : 1998-11 genannten Verfahren erfolgen.

BEISPIEL: Kolorimetrischer Nachweis mittels einer Bestätigungsreaktion in Mikrotiterplatten

Folgende Schritte sind dazu erforderlich.

- Denaturierung der markierten Amplifikate (siehe Anhang B);
- Hybridisierung der Amplifikate an die in der Mikrotiterplatte fixierte Sonde;
- Zugabe des Konjugates, bestehend aus Anti-DIG und POD;
- Zugabe des chromogenen Substrates und Messung der Extinktion.

Alternativ kann der im Beispiel beschriebene kolorimetrische Nachweis auch durch Variation der o.g. Schritte und/oder durch die Verwendung eines anderen Markierungssystems erfolgen.

6 Chemikalien und Reagenzien

6.1 Allgemeines

Es gelten die grundsätzlichen Anforderungen nach 8.1 von DIN 10134 : 1998-11.

6.2 Nährmedien

6.2.1 Nichtselektive Nährmedien

Zur nichtselektiven mikrobiellen Anreicherung eignet sich z. B. gepuffertes Peptonwasser gemäß L00.00-20. Alternativ dürfen auch andere wissenschaftlich erprobte Anreicherungsmedien wie z. B. sterile H-Milch eventuell unter Zusatz von Hemmsubstanzen verwendet werden.

6.2.2 Selektive Nährmedien

Zur selektiven mikrobiellen Anreicherung eignen sich z. B. Rappaport-Vassiliadis-Medium gemäß L00.00-20 oder Selenit-Cystin-Medium. Alternativ dürfen auch andere wissenschaftlich erprobte Anreicherungsverfahren verwendet werden.

6.3 Nukleinsäureextraktion und -reinigung

6.3.1 Waschpuffer

Als Waschpuffer können z. B. physiologische Kochsalzlösung oder einfachkonzentrierte PBS verwendet werden.

6.3.2 Reinigung der Nukleinsäure

Die Reinigung des Nukleinsäureextrakts erfolgt z. B. über eine Silicamembran¹⁾.

Bei der Verwendung von fertigen Kits sind die Arbeitsvorschriften der Hersteller zu berücksichtigen.

6.4 PCR-Reagenzien

6.4.1 Allgemeines

Die Reagenzien werden nach den Angaben des Herstellers aufbewahrt.

¹⁾ Über Bezugsquellen gibt Auskunft: Normenausschuß Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin, Postanschrift 10772.

6.4.2 Thermostabile DNA-Polymerase

Bei der PCR wird eine thermostabile DNA-Polymerase, z. B. Taq-DNA-Polymerase, eingesetzt, die von verschiedenen Herstellern als hochgereinigte Enzympräparation bezogen werden kann. Es muß sichergestellt sein, daß die verwendete Enzympräparation frei von Salmonellen-DNA ist und keine weiteren mit der PCR interferierenden Enzymaktivitäten enthält.

6.4.3 Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTP)

Es sind Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTP) nach 8.3 von DIN 10134 : 1998-11 zu verwenden.

6.4.4 Uracil-N-Glykosylase

Beim Einsatz von Uracil-N-Glykosylase ist 8.3 von DIN 10134 : 1998-11 zu beachten.

6.4.5 Reaktionspuffer

Der Reaktionspuffer beinhaltet eine bestimmte Ionenkonzentration und Additiva, die auf die verwendete thermostabile DNA-Polymerase nach 6.4.2 abgestimmt sind.

6.4.6 Oligonukleotide (Primer und Sonden)

Einige spezifische Oligonukleotide für den Nachweis von Salmonellen-DNA [1] bis [3] sind beispielhaft in Tabelle B.1 aufgeführt.

BEISPIEL: Für den in dieser Norm beschriebenen PCR-ELISA werden die publizierten Oligonukleotide ST 11 und ST 15 [1] als Primer verwendet, wobei einer der Primer (ST 15) am 5'-Ende mit Digoxigenin markiert ist. Zur Hybridisierung und Detektion in der Mikrotiterplatte werden mit Biotin 5'-endmarkierte Oligonukleotide als Salmonellen-spezifische Sonde (WT-Sonde) bzw. als Sonde für die interne Amplifikationskontrolle (ST-Sonde) eingesetzt [2]. Das Markierungssystem beruht einerseits auf der Biotin-Kopplung von Sonden an die Mikrotiterplatte über Streptavidin, andererseits auf der Digoxigenin-Markierung eines Primers zur kolorimetrischen Detektion des hybridisierten Amplifikat-Einzelstranges mit der entsprechenden Sonde unter Einsatz eines spezifischen Anti-DIG-Enzymkomplexes und Zusatz eines Chromogens.

6.5 Detektion spezifischer Amplifikate

6.5.1 Allgemeines

Es sind geeignete Detektionssysteme (siehe 5.5 von DIN 10134 : 1998-11) zu verwenden.

6.5.2 Detektion spezifischer Amplifikate für den in dieser Norm exemplarisch dargestellten PCR-ELISA

Für den nach 5.5 beispielhaft aufgeführten kolorimetrischen Nachweis sind die folgenden Materialien zu verwenden.

BEISPIEL:

a) Mikrotiterplatten

Zum Nachweis der PCR-generierten Amplifikate können geeignete Mikrotiterplatten (z. B. Streptavidin-beschichtet und mit einer Biotin-Bindekapazität von mindestens 5 ng [= 20 pmol] je Kavität) über den Handel bezogen werden¹⁾.

b) Bindungspuffer

Tris-HCl	$c = 10 \text{ mmol/l}$
Natriumchlorid	$c = 100 \text{ mmol/l}$
Na ₂ EDTA-Dihydrat	$c = 1 \text{ mmol/l}$
Octylphenol-polyethylenglycolether ¹⁾	$\varphi = 0,15 \%$
pH =	$7,5 \pm 0,1$

¹⁾ Siehe Seite 2.

²⁾ Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edi. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory.

c) Denaturierungsreagenz

Natronlauge	$c = 0,125 \text{ mol/l}$
Na ₂ EDTA-Dihydrat	$c = 0,02 \text{ mol/l}$

d) Hybridisierungspuffer

SSC-Lösung 2,5fach:

(Herstellung einer 20fachen SSC-Lösung:

175,3 g NaCl und 88,2 g Natriumcitrat-Dihydrat in 800 ml H₂O lösen; mit wenigen Tropfen einer 10 mol/l NaOH-Lösung auf pH = $7,4 \pm 0,1$ einstellen, auf 1 l mit bidestilliertem Wasser auffüllen, mischen und autoklavieren.)

Denhardt's Lösung²⁾ 2fach:

(Herstellung einer 10fachen Denhardt's Lösung:

2 g synthetisches Polymer mit einem Molekulargewicht von etwa 400.000 aus Saccharose und Epichlorhydrin¹⁾, 2 g Polyvinylpyrrolidon, 2 g BSA [Fraktion V] in 1 l bidestilliertem Wasser.)

Tris-HCl	$c = 10 \text{ mmol/l}$
Na ₂ EDTA-Dihydrat	$c = 1 \text{ mmol/l}$
pH =	$7,5 \pm 0,1$

e) Waschpuffer 1

SSC 0,1fach

Denhardt's Lösung 2fach

Tris-HCl	$c = 10 \text{ mmol/l}$
Na ₂ EDTA-Dihydrat	$c = 1 \text{ mmol/l}$
pH =	$7,5 \pm 0,1$

f) Waschpuffer 2

Tris-HCl	$c = 100 \text{ mmol/l}$
Natriumchlorid	$c = 150 \text{ mmol/l}$
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat ¹⁾	$\omega = 0,05 \%$
Blocking Reagenz ¹⁾	$\omega = 0,5 \%$
Heringssperma-DNA	$\beta = 100 \text{ mg/l}$
pH =	$7,5 \pm 0,1$

g) Anti-Digoxigenin-Antikörper

Anti-DIG-POD-Konjugat, Fab-Fragment, nach Angaben des Herstellers in Verdünnung einsetzen¹⁾.

h) Farbsubstrat, z. B. TMB¹⁾ und H₂O₂ (auch als gebrauchsfertige Lösung erhältlich).

i) Stopplösung, z. B. 1 mol/l H₂SO₄-Lösung.

7 Geräte

7.1 Allgemeines

Alle Glasgeräte müssen vor Verwendung gereinigt, hitze-sterilisiert und frei von DNA sein, Kunststoffgeräte müssen steril und frei von DNA sein. Sämtliche Pipetten, Reaktionsgefäße und Geräte nach 7.4.3 müssen auch die Anforderungen nach 7.2 von DIN 58967-60 : 1995-01 erfüllen.

7.2 Mikrobielle Anreicherung

7.2.1 Geräte zur Homogenisierung von Untersuchungsmaterial

Vor Untersuchungsbeginn ist durch geeignete Maßnahmen sicherzustellen, daß ein ausreichender Homogenisierungsgrad des Untersuchungsmaterials erreicht wird. Dies kann je nach Beschaffenheit der zu untersuchenden Probe durch thermische (z. B. Aufschmelzen bei 37 °C) oder mechanische (z. B. Homogenisator, Mixgeräte, Beutelwalkmischer) Verfahren erreicht werden.

7.2.2 Brutschränke oder Wasserbäder zum Bebrüten der beimpften flüssigen Nährmedien, temperierbar auf 37 °C ± 1 °C und ggf. auf 42 °C ± 1 °C

7.2.3 Kulturgefäße mit geeignetem Fassungsvermögen