

DIN 10135**DIN**

ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2012-04-12
Vorgesehen als Ersatz für
DIN 10135:1999-11**Entwurf****Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Umweltproben –
Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen
Mikroorganismen in Lebensmitteln –
Verfahren zum Nachweis von Salmonellen**

Microbiology of food, feeding stuffs and environmental samples –
Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens –
Method for the detection of salmonella

Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et des échantillons
d'environnement –
Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection des micro-organismes
pathogènes dans les aliments –
Méthode de recherche des salmonella

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2011-12-05 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses
Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise als Datei per E-Mail an nal@din.de in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann
im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter
www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder in Papierform an den Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im
DIN, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 28 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	5
4 Symbole und Abkürzungen	6
5 Kurzbeschreibung	7
6 Chemikalien und Reagenzien	8
7 Geräte	9
8 Durchführung	10
9 Dokumentation	11
Anhang A (informativ) Thermischer Zellaufschluss	12
Anhang B (informativ) Amplifikationskontrollen	13
Anhang C (informativ) PCR-ELISA zum Nachweis von Salmonellen	16
Anhang D (informativ) Real-time-PCR Assay zum Nachweis von Salmonellen	21
Anhang E (informativ) Ringversuchsergebnisse	27
Literaturhinweise	28

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte, Arbeitskreis NA 057-01-06-01 AK „Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von Mikroorganismen“, erarbeitet.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. Das DIN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Änderungen

Gegenüber DIN 10135:1999-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Norm wurde in der Struktur geändert und enthält neu die Anhänge A bis E;
- b) als weiteres Verfahren wurde ein Real-time-PCR Assay zum Nachweis von Salmonellen aufgenommen.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt ein Verfahren zum Nachweis von Salmonellen in Lebensmitteln und Futtermitteln und aus diesen gewonnenen Isolaten mit der Polymerase-Kettenreaktion einschließlich der Real-time-PCR fest. Diese Norm gilt

- für Erzeugnisse, die für den menschlichen Verzehr oder als Futtermittel bestimmt sind,
- für Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und der Behandlung von Lebensmitteln, und
- für die Primärproduktion.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

DIN EN ISO 6579, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zum Nachweis von Salmonella spp.*

DIN EN ISO 6887-1, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen*

DIN EN ISO 6887-2, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 2: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Fleisch und Fleischerzeugnissen*

DIN EN ISO 6887-3, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 3: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Fisch und Fischerzeugnissen*

DIN EN ISO 6887-4, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 4: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von anderen Erzeugnissen als Milch und Milcherzeugnissen, Fleisch und Fleischerzeugnissen, Fisch und Fischerzeugnissen*

DIN EN ISO 6887-5, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 5: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Milch und Milcherzeugnissen*

DIN EN ISO 6887-6, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 6: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Proben aus der Primärproduktion*

DIN EN ISO 7218, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen*

DIN EN ISO 20837:2006-08, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis (ISO 20837:2006); Deutsche Fassung EN ISO 20837:2006*

DIN EN ISO 20838, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Anforderungen an Amplifikation und Nachweis bei qualitativen Verfahren*

DIN EN ISO 22118, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Leistungsmerkmale*

DIN EN ISO 22119, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe*

DIN EN ISO 22174, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach DIN EN ISO 22174, DIN EN ISO 22119 und die folgenden Begriffe.

3.1

Salmonellen

Gram-negative Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae*

ANMERKUNG Die Gattung *Salmonella* umfasst die beiden Arten *Salmonella enterica*, mit sechs bekannten Unterarten, und *Salmonella bongori*.

3.2

Salmonellen-spezifische DNS-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

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

3.4

Real-time-Polymerase-Kettenreaktion

Real-time-PCR

enzymatisches Verfahren, bei dem die In-vitro-Amplifikation bestimmter DNS-Abschnitte durch einen Prozess der Denaturierung, Anlagerung (Annealing) spezifischer Primer und DNS-Synthese mit dem Nachweis spezifischer PCR-Produkte (Amplifikate) während des Amplifikationsprozesses kombiniert wird

ANMERKUNG Im Allgemeinen enthält das Reaktionsgemisch für die Amplifikation eine oder mehrere spezifische DNS-Sonden, die mit einem oder mehreren Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Bei der Anwendung dieser Technik wird das Signal nach spezifischer Hybridisierung der Sonden an die Nukleinsäure-Zielsequenz und Anregung mit Licht definierter Wellenlänge erzeugt.

4 Symbole und Abkürzungen

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Symbole und Abkürzungen.

c	Stoffmengenkonzentration
g	$9,81 \text{ ms}^{-2}$
w	Massenanteil
ρ	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.
Anti-DIG	Anti-Digoxigenin-Antikörper
BHQ2:	N-Nitrophenylazo-dimethoxy-phenylazo-phenyl-N-dimethoxytrityloxy-ethyl-2-aminoethyl-1-oxyglycolate (Black-Hole Quencher 2)
BPW	Gepuffertes Peptonwasser
BSA	Bovines Serum Albumin
DNS	Desoxyribonukleinsäure (en: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
dATP	Desoxyadenintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dsDNS	Doppelstrang-DNS
Na ₂ EDTA	Dinatriumsalz der Ethylendiamintetraessigsäure, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
FAM	6-Carboxyfluorescein
h	Stunde
HEX	Hexachloro-6-carboxy-fluoreszein
IK-	Interne Amplifikationskontroll-
IK-DNS	Interne Amplifikationskontroll-DNS
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
min	Minute
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (en: phosphate-buffered-saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (en: polymerase chain reaction)
POD	Peroxidase

ROX	Carboxy-X-Rhodamin
RVS-Medium	Magnesiumchlorid-Malchitgrün-Medium nach Rappaport-Vassiliadis mit Soja
s	Sekunden
SSC	Standard Saline Citrat
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TexasRed	Sulforhodamin-101-Sulfonylchlorid
T_m	Schmelzpunkttemperatur
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid

5 Kurzbeschreibung

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;
- Detektion mit einer Bestätigungsreaktion mittels Hybridisierung oder DNS-Sequenzierung (siehe 5.4).

ANMERKUNG Bei der Real-time-PCR erfolgt die spezifische Amplifikation und Detektion üblicherweise fortlaufend in einem Schritt ohne das Reaktionsgefäß zwischen beiden Schritten öffnen zu müssen.

Um eine PCR-Inhibition durch die Matrix zu erfassen, muss eine Kontroll-DNS in der gleichen Matrix amplifiziert werden, siehe Anhang B zu Amplifikationskontrollen.

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 dem kulturellen Verfahren nach DIN EN ISO 6579 entsprechen. Für die Probenvorbereitung von Lebensmitteln und Proben aus der Primärproduktion gelten für die jeweils spezifische Anwendung die DIN EN ISO 6887-1 bis DIN EN ISO 6887-6.

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. Es gelten die in DIN EN ISO 20837 festgelegten Anforderungen an die Probenvorbereitung für den qualitativen Nachweis.

5.4 Amplifikation mittels PCR und Detektion spezifischer Amplifikate

Ein festgelegtes Volumen an extrahierter Nukleinsäure wird zu einem PCR-Ansatz gegeben und in einem Gerät amplifiziert, welches die verschiedenen Temperatur- und Zeitzyklen, die für die PCR notwendig sind, reproduzierbar durchführt. Die Temperaturdifferenz zwischen den Reaktionsansätzen in verschiedenen Reaktionsgefäßen darf ± 1 °C nicht überschreiten. Bei Verwendung eines Gerätes ohne Deckelheizung müssen die Reaktionsansätze mit geeigneten Maßnahmen vor Evaporation geschützt werden. Bei Verwendung eines Real-Time PCR Gerätes muss die optische Detektionseinheit geeignet sein, Fluoreszenzsignale zwischen den Amplifikationszyklen zuverlässig zu detektieren.

ANMERKUNG Bei der Real-time-PCR erfolgt die spezifische Amplifikation und Detektion in einem Schritt.

Die Spezifität der Amplifikate muss mittels einer Hybridisierung (z. B. Oligonukleotid-Sonde) oder DNS-Sequenzierung nachgewiesen bzw. bestätigt werden. Beispiele sind informativ in Anhang C (Kolorimetrischer Nachweis mittels einer Bestätigungsreaktion in Mikrotiterplatten) und D.1 bis D.3 (Real-time-PCR Verfahren) genannt.

Ein mikrobiologisch-kultureller Befund kann auch zur Bestätigung herangezogen werden.

6 Chemikalien und Reagenzien

6.1 Allgemeines

Es gelten die grundsätzlichen Anforderungen nach DIN EN ISO 22174.

6.2 Nährmedien

6.2.1 Nichtselektive Nährmedien

Zur nichtselektiven mikrobiellen Anreicherung eignet sich z. B. gepuffertes Peptonwasser nach DIN EN ISO 6579. 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 Medien nach DIN EN ISO 6579, z. B. Rappaport-Vassiliadis-Medium mit Soja. Alternativ dürfen auch andere wissenschaftlich erprobte Anreicherungsverfahren verwendet werden.

6.3 Nukleinsäureextraktion und -reinigung

Besondere Anforderungen an die Nukleinsäureextraktion und -reinigung werden in DIN EN ISO 20837 festgelegt.

Anhang A legt informativ die Durchführung eines thermischen Zellaufschlusses fest. Im Handel erhältliche Extraktions- und Purifikationssysteme dürfen bei Eignung angewendet werden. Die jeweiligen Herstellerangaben sind zu beachten.

6.4 Reagenzien

In allen Fällen sind analysereine, für molekularbiologische Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen und Viren geeignete Reagenzien zu verwenden. Die Reagenzien werden nach den Angaben des Herstellers aufbewahrt. Es ist im Allgemeinen ratsam, Aliquote der für ein PCR-Verfahren notwendigen Reaktionslösungen zu verwenden. Besondere Anforderungen von Reagenzien sind in DIN EN ISO 20838 und im Falle der Anwendung von Real-time-PCR Verfahren in DIN EN ISO 22119 festgelegt.

7 Geräte

7.1 Allgemeines

Sämtliche Pipetten, Reaktionsgefäße und Geräte müssen die Anforderungen nach DIN EN ISO 7218, DIN EN ISO 20837, DIN EN ISO 22119 und DIN EN ISO 22174 erfüllen. Alle Glas- und Kunststoffgeräte müssen vor Verwendung gereinigt, steril und frei von DNS sein.

7.2 Mikrobielle Anreicherung

7.2.1 Geräte zur Homogenisierung von Untersuchungsmaterial

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

7.2.4 Messpipetten, mit einem Pipettivolumen von 10 ml bis 100 ml

7.3 Nukleinsäureextraktion

7.3.1 Mikroliterpipetten, mit variabel einstellbaren Pipettivolumina, z. B. 1 µl bis 10 µl, 10 µl bis 100 µl und 0,1 ml bis 1 ml

7.3.2 Tischzentrifuge, für Mikroliter-Reaktionsgefäße mit einem Volumen von 1,5 ml bis 2 ml und einer Beschleunigung, variabel einstellbar, bis 10 000 × g

7.3.3 Thermoblock, für Mikroliter-Reaktionsgefäße, beheizbar bis 100 °C

7.3.4 mechanisches Schnellschüttelgerät

7.4 PCR

7.4.1 Mikroliterpipetten, mit variabel einstellbaren Pipettivolumina, z. B. 1 µl bis 10 µl, 10 µl bis 100 µl

7.4.2 Tischzentrifuge, für Mikroliter-Reaktionsgefäße mit einem Volumen bis 0,5 ml und einer Beschleunigung, variabel einstellbar, bis 10 000 × g

7.4.3 Gerät, das die verschiedenen Temperatur- und Zeitzyklen, die für die PCR notwendig sind, reproduzierbar durchführt. Die Temperaturdifferenz zwischen den Reaktionsansätzen in verschiedenen Reaktionsgefäßen darf ± 1 °C nicht überschreiten. Bei Verwendung eines Gerätes ohne Deckelheizung müssen die Reaktionsansätze mit geeigneten Maßnahmen vor Evaporation geschützt werden. Bei Anwendung der Real-time-PCR ist ein Gerät notwendig, das auch zuverlässig Fluoreszenzsignale detektieren kann.

7.4.4 PCR-Reaktionsgefäße, oder Glaskapillaren geeignet für das jeweilige Gerät, siehe 7.4.3

7.5 Detektion spezifischer Amplifikate

Es gelten die allgemeinen Anforderungen aus DIN EN ISO 22174 und DIN EN ISO 22119.