

DIN EN ISO 6579-4



ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2024-02-15

Entwurf

**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

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des Salmonella –
Partie 4: Identification de Salmonella Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) monophasique par réaction
de polymérisation en chaîne (PCR) (ISO/DIS 6579-4:2023);
Version allemande et anglaise prEN ISO 6579-4:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-12-15 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

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

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 82 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 6579-4:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 6579-1	siehe	DIN EN ISO 6579-1
ISO 11133	siehe	DIN EN ISO 11133
ISO 16140-6	siehe	DIN EN ISO 16140-6
ISO 17468	siehe	DIN EN ISO 17468
ISO 20836	siehe	DIN EN ISO 20836
ISO 20837	siehe	DIN EN ISO 20837
ISO 20838	siehe	DIN EN ISO 20838
ISO 22119:2011	siehe	DIN EN ISO 22119:2011-11
ISO/TR 6579-3	siehe	DIN CEN ISO/TR 6579-3

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TR 6579-3, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen — Teil 3: Leitfaden für die Serotypisierung von Salmonella spp.*

DIN EN ISO 6579-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen — Teil 1: Nachweis von Salmonella spp.*

DIN EN ISO 11133, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

DIN EN ISO 16140-6, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 6: Arbeitsvorschrift für die Validierung von (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung*

DIN EN ISO 17468, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Technische Anforderungen und Leitfaden zur Einführung oder Überarbeitung von genormten Referenzverfahren*

DIN EN ISO 20836, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Mikroorganismen — Temperaturleistungsprüfung für Thermocycler*

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

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 22119:2011-11, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Allgemeine Anforderungen und Begriffe (ISO 22119:2011); Deutsche Fassung EN ISO 22119:2011*

– *Entwurf* –

E DIN EN ISO 6579-4:2024-01

– Leerseite –

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)

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)

Microbiologie de la chaîne alimentaire – Méthode horizontale pour la recherche, le dénombrement et le sérotypage des Salmonella – Partie 4: Identification de Salmonella Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) monophasique par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (ISO/DIS 6579-4:2023)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	9
4.1 Allgemeines	9
4.2 Vorbereitung von gut voneinander getrennten Kolonien	9
4.3 Suspension der Kolonie	9
4.4 Amplifikation und Nachweis	9
5 Nährmedien und Reagenzien	9
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien	9
7 Präsumtiver monophasischer Stamm von <i>Salmonella</i> Typhimurium (Isolat)	10
8 Kultivierung des Isolats	10
9 Durchführung	10
9.1 Anfertigung von Zellsuspension oder DNS	10
9.2 PCR-Amplifikation und Nachweis	11
9.2.1 Allgemeines	11
9.2.2 PCR-Kontrollen	11
10 Darstellung der Ergebnisse	11
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens	11
11.1 Validierung nach ISO 17468	11
11.2 Leistungsmerkmale	12
11.2.1 Studie zur Verfahrensbewertung	12
11.2.2 Ringversuch	12
12 Prüfbericht	12
13 Qualitätssicherung	13
Anhang A (informativ) Nährmedien und Reagenzien	14
A.1 Allgemeines	14
A.2 Nähragar (Beispiel für ein nicht selektives Medium)	14
A.2.1 Zusammensetzung	14
A.2.2 Herstellung	14
A.2.3 Herstellung der Nähragarplatten	14
A.3 Kochsalzlösung (0,85 % w/v)	15
A.3.1 Zusammensetzung	15
A.3.2 Herstellung	15
A.4 Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien	15
Anhang B (informativ) Probenbasierter Multiplex-Real-time-PCR-Test zur Identifizierung von monophasischem <i>Salmonella</i> Typhimurium (1,4[5],12:i:-)	16
B.1 Allgemeines	16
B.2 Durchführung	16
B.2.1 Kurzbeschreibung	16
B.2.2 Reagenzien für PCR	16
B.2.3 Aufbau von Real-time-PCR	17
B.3 Auswertung der PCR-Ergebnisse	19
Anhang C (informativ) Agarosegel-basierter Multiplex-Real-time-PCR-Test zur Identifizierung von monophasischem <i>Salmonella</i> Typhimurium (1,4[5],12:i:-)	21
C.1 Allgemeines	21
C.2 Durchführung	21
C.2.1 Kurzbeschreibung	21

C.2.2	Reagenzien für PCR	21
C.2.3	Multiplex-PCR-Aufbau	22
C.2.4	Agarosegel-Elektrophorese	23
C.3	Auswertung der PCR-Ergebnisse	25
Anhang D (informativ) Agarosegel-basierter Einzelziel-PCR-Test zur Identifizierung von monophasischem <i>Salmonella</i> Typhimurium (1,4[5],12:i:-)		27
D.1	Allgemeines	27
D.2	Durchführung	27
D.2.1	Kurzbeschreibung	27
D.2.2	Reagenzien für PCR	27
D.2.3	Einzelziel-PCR-Aufbau	28
D.2.4	Agarosegel-Elektrophorese	30
D.3	Auswertung der PCR-Ergebnisse	33
Anhang E (informativ) Leistungsmerkmale		34
E.1	Studie zur Verfahrensbewertung	34
E.2	Ringversuch	36
E.2.1	Allgemeines	36
E.2.2	Ergebnisse der Multiplex-Real-time-PCR	37
E.2.3	Ergebnisse der gelbasierten Multiplex-PCR	38
E.2.4	Ergebnisse der gelbasierten Einzelziel-PCR	38
E.2.5	Leistungsmerkmale des Ringversuchs	38
Literaturhinweise		41

Tabellen

Tabelle A.1	Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien	15
Tabelle B.1	Sequenzen der Primer und Sonden	17
Tabelle B.2	Herstellung der Reaktionsmischung	17
Tabelle B.3	Temperatur-Zeit-Programm	19
Tabelle B.4	Auswertung der PCR-Ergebnisse	19
Tabelle C.1	Sequenzen der Primer	21
Tabelle C.2	Herstellung der Reaktionsmischung	22
Tabelle C.3	Temperatur-Zeit-Programm	23
Tabelle C.4	Auswertung der PCR-Ergebnisse (erwartete Fragmentgröße in bp)	26
Tabelle D.1	Sequenzen der Primer	28
Tabelle D.2	Herstellung der Reaktionsmischung für die Zielsequenz <i>fliA</i> -IS200	28
Tabelle D.3	Herstellung der Reaktionsmischung für die Zielsequenz <i>fljB-hin</i>	29
Tabelle D.4	Herstellung der Reaktionsmischung für die Zielsequenz <i>hin-iroB</i>	29
Tabelle D.5	Temperatur-Zeit-Programm	30
Tabelle D.6	Auswertung der PCR-Ergebnisse (erwartete Fragmentgröße in bp)	33
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	35
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	35
Tabelle E.3	Einzelheiten über den Ringversuch der drei PCR-Tests	39
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	40

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 6579-4:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 6579-4:2023 wurde von CEN als prEN ISO 6579-4:2023 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Directives, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Directives, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patentерklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, erarbeitet.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 6579 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

In verschiedenen (internationalen, regionalen, nationalen) Gesetzen sind gesetzliche Grenzwerte festgelegt, um die „Abwesenheit“ von *Salmonella* spp. in Proben der Lebensmittelkette sicherzustellen. Außerdem verlangen verschiedene (EG-)Verordnungen die Abwesenheit von bestimmten *Salmonella*-Serovaren, die nachweislich einen relativ hohen Prozentsatz von menschlicher Salmonellose verursachen. Einer dieser *Salmonella*-Serovare, für die gesetzliche Kriterien festgelegt sind, ist *Salmonella* Typhimurium, einschließlich seiner monophasischen Variante 1,4[5],12:i:- (z. B. Verordnung (EG) Nr. 1086/2011 [8]). Daher ist es von Bedeutung zu wissen, dass ein Serovar mit der Antigenformel 1,4[5],12:i: gefunden wurde, der tatsächlich die monophasische Variante eines *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:1,2) ist und nicht die eines anderen *Salmonella*-Serovars, für das keine Kriterien festgelegt sind, wie *S. Lagos* (1,4[5],12:i:1,5), *S. Agama* (4,12:i:1,6), *S. Farsta* (4[5],12:i:e,n,x), *S. Tsevie* (1,4,12:i:e,n,z₁₅), *S. Gloucester* (1,4,12,27:i:l,w) oder *S. Tumodi* (1,4,12:i:z₆). Ein konformativer Unterschied zwischen *Salmonella* Typhimurium- und *Salmonella* non-Typhimurium-Serovaren kann, wie die PCR-Technik(en), die in diesem Dokument beschrieben werden, mittels Molekularanalyse bestimmt werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument spezifiziert ein horizontales In-vitro-Verfahren für die molekulare Identifizierung und Differenzierung der monophasischen Variante von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (1,4[5],12:i:-), bei der die zweite H-Phase H:1,2 fehlt oder nicht exprimiert wird, und mit den Isolaten beginnt. Dieses Verfahren weist spezifische DNS-Sequenzen einer intergenischen Region der ersten H-Phase des Flagellen-Clusters nach, um *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (im folgenden *Salmonella* Typhimurium) sowie spezifische DNS-Sequenzen von Genen, die mit der zweiten H-Phase der Flagellen-Antigen-Expression verbunden sind, zu identifizieren.

Das Verfahren ist anwendbar zur:

- Differenzierung des untersuchten Isolats zwischen monophasischem *Salmonella* Typhimurium und der monophasischen Variante eines anderen *Salmonella* non Typhimurium-Serovars, das die gleiche Antigenformel hat;
- Identifizierung des untersuchten Isolats, das entweder ein monophasisches *Salmonella* Typhimurium oder ein (biphasisches) *Salmonella* Typhimurium ist.

Dieses Dokument ist anwendbar auf die Untersuchung einer zur Gattung Salmonellen gehörenden Reinkultur, welche isoliert ist von:

- Produkten, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind;
- Produkten, die als Futtermittel vorgesehen sind;
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und Handhabung von Lebensmitteln und Futtermitteln;
- Proben aus dem Bereich der Primärproduktion.

Dieses Dokument kann zur Identifizierung von monophasischem *Salmonella* Typhimurium auch in anderen Bereichen (z. B. Umwelt, Gesundheit von Menschen, Gesundheit von Tieren) angewandt werden.

WARNUNG — Um die Gesundheit des Laborpersonals sicherzustellen, ist es unerlässlich, dass Untersuchungen zum Nachweis von Salmonellen nur in ordnungsgemäß ausgestatteten Laboren unter Aufsicht eines erfahrenen Mikrobiologen vorgenommen werden und dass das gesamte inkubierte Material mit größter Sorgfalt entsorgt wird. Personen, die dieses Dokument anwenden, sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, dass alle mit seiner Anwendung verbundenen Sicherheitsaspekte angesprochen werden. Es obliegt der Verantwortung des Anwenders, angemessene Sicherheits- und Gesundheitsschutzmaßnahmen zu treffen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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).

ISO 6579-1, *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Horizontal method for the detection of Salmonella spp.*

ISO/TR 6579-3, *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 3: Guidelines for serotyping of Salmonella spp.*

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

ISO 20836, *Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of microorganisms — Thermal performance testing of thermal cyclers*

ISO 20837, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Requirements for sample preparation for qualitative detection*

ISO 20838, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — Requirements for amplification and detection for qualitative methods*

ISO 22119:2011, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions*

ISO 22174, *Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of microorganisms — General requirements and definitions*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 22174 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

monophasisches *Salmonella* Typhimurium

Variante eines *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, mit der Antigenformel 1,4[5],12:i:-, bei der die zweite H-Phase fehlt

3.2

präsumtiver monophasischer Stamm von *Salmonella* Typhimurium (Isolat)

Reinkultur, die als zugehörig zur Gattung *Salmonella* charakterisiert wird und eine positive Reaktion auf das O-Antigen O:4 und das H-Antigen H:i sowie eine negative Reaktion auf die zweite H-Phase H:1,2 zeigt

3.3

Schwellenwert-Zyklus-Schnittpunkt

Punkt auf der Amplifikationskurve, bei dem ein fluoreszierendes Signal über die Grundlinie ansteigt oder einen vordefinierten Schwellenwert überschreitet

[QUELLE: ISO 22119:2011, 3.17]

3.4

Quantifizierungszyklus

C_q, C_t, C_p, TOP

Zyklus bei der Real-time-PCR, bei dem das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden kann und der in die exponentielle Phase der Amplifikation der Zielsequenz übergeht

Anmerkung 1 zum Begriff: Quantifizierungszyklus (C_q) ist ein allgemeiner Begriff, der die Begriffe Zyklusschwellenwert (C_t, en: cycle threshold), Kreuzungspunkt (C_p, en: crossing point), Übergangspunkt (TOP, en: take off point) und alle anderen gerätespezifischen Begriffe einschließt, die sich auf den Anteil der Zyklen beziehen, der zum Nachweis oder zur Quantifizierung der Zielsequenz bei der Real-time-PCR verwendet wird.

Anmerkung 2 zum Begriff: Der Quantifizierungszyklus basiert entweder auf einem Schwellenwert, der auf alle Proben angewendet wird, oder auf einer Regressionsanalyse des Signals für jede einzelne Probe.

[QUELLE: ISO 22174, 3.58]

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Die Identifizierung einer monophasischen Variante von *Salmonella* Typhimurium besteht aus den folgenden drei aufeinanderfolgenden Schritten (siehe 4.2 bis 4.4).

4.2 Vorbereitung von gut voneinander getrennten Kolonien

Die Kultur wird auf die Oberfläche eines (vorgetrockneten) nicht-selektiven festen Nährmediums gestrichen und zwischen 34 °C und 38 °C für 24 h inkubiert, um gut isolierte Kolonien zu erhalten.

4.3 Suspension der Kolonie

Es wird eine gut isolierte Kolonie bestimmt und in 100 µl Kochsalzlösung (0,85 % w/v) oder in 100 µl geeignetem PCR-Wasser suspendiert.

4.4 Amplifikation und Nachweis

Die suspendierten Bakterienzellen werden mittels PCR untersucht, um die genetischen Sequenzen, die eindeutig für *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:1,2) sind, und dessen monophasische Variante, bei der die zweite H-Phase (1,4[5],12:i:-) fehlt, sowie spezifische genetische Sequenzen der Genen, die der zweiten H-Phase der Flagellen-Antigen-Expression zugeordnet werden, nachzuweisen. Spezifische PCR-Tests, einschließlich Primern und Sonden sind in Anhang B bis Anhang D beschrieben.

5 Nährmedien und Reagenzien

Es werden aktuelle Laborpraktiken nach ISO 7218 befolgt. Für die Schritte 4.3 und 4.4 müssen molekulare Reagenzien und für die Molekularbiologie geeignete Verbrauchsmaterialien, wie in ISO 20837 und ISO 20838 angezeigt, verwendet werden. Die Zusammensetzung der Nährmedien und Reagenzien und ihre Herstellung sind in Anhang A festgelegt. Zur Leistungsprüfung von Nährmedien werden die Verfahren nach ISO 11133 und Abschnitt A.4 angewandt. Die Primer und Sonden für die Identifizierung der monophasischen Variante von *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-) sind in Anhang B bis Anhang D aufgeführt.

6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

Geräte zum Einmalgebrauch mit geeigneten Kennwerten sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten. Die üblichen Geräte eines mikrobiologischen Labors (siehe ISO 7218) und insbesondere die folgenden Geräte müssen verwendet werden.

6.1 Brutschrank, auf einen Bereich zwischen 34 °C und 38 °C einstellbar.

ANMERKUNG Der Bereich zwischen 34 °C und 38 °C für die Inkubation von Medien umfasst die Verwendung eines Inkubators bei 35 ± 1 °C, 36 ± 2 °C oder 37 ± 1 °C.

6.2 Sterile Impfösen, von ungefähr 3 mm Durchmesser (10 µl) und 0,3 mm (1 µl) sowie Impfnadel oder Impfdraht.

6.3 Wasserbad, auf 47 °C bis 50 °C einstellbar.

6.4 Kühlschrank, auf 5 °C ± 3 °C einstellbar.

- 6.5 **Trocken-** oder **Wärmeschränk**, auf einen Bereich zwischen 25 °C und 50 °C einstellbar.
- 6.6 **pH-Messgerät**, mit einer Fehlergrenze der Kalibrierung von $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei 20 °C bis 25 °C.
- 6.7 **Ausrüstung zur Suspension einer Kolonie**, z. B. (Mikro-) Zentrifugenröhrchen.
- 6.8 **Messpipetten** und **Pipettenfilterspitzen**, für Volumina zwischen 0,2 µl und 13,55 µl, je nach dem verwendeten PCR-Test. Für weitere Reaktionen je Mischung werden größere Volumina benötigt.
- 6.9 **Mischer**.
- 6.10 **Sterile Petrischalen**, mit einem Durchmesser von etwa 90 mm.
- 6.11 **Ausrüstung für PCR und Real-time-PCR**, z. B. Mikrozentrifugen oder Plattenzentrifugen.
- 6.12 **Thermocycler** oder **Real-time-PCR-Thermocycler**, kalibriert nach ISO 20836.
- 6.13 **Zugehörige Verbrauchsmaterialien für konventionelle oder Real-time-PCR**, z. B. PCR-Röhrchen, optische Platten und Dichtungen, optische Plattenhalter, geeignet zur Verwendung mit dem gewählten PCR-Gerät.
- 6.14 **Gerät für die Trockensterilisation (Heißluft-Sterilisator) oder Dampfsterilisation (Autoklav)**.

Wie in ISO 7218 festgelegt.

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

Das für die weitere Identifizierung zu verwendende Isolat muss eine Reinkultur sein, die als zugehörig zur Gattung *Salmonella* (siehe ISO 6579-1) charakterisiert wird. Ein präsumtives monophasisches *Salmonella* Typhimurium-Isolat wird eine positive Reaktion auf das O-Antigen 0:4 und das H-Antigen H:i sowie eine negative Reaktion auf die zweite H-Phase H:1,2 zeigen (siehe ISO/TR 6579-3).

8 Kultivierung des Isolats

Die Kultur von Abschnitt 7 (z. B. mit einer 10 µl-Impföse; 6.2) wird auf die Oberfläche eines nicht-selektiven Agarmediums (z. B. Nähragar; A2) gestrichen, um gut isolierte Kolonien zu erhalten. Die Platten werden in umgedrehtem Zustand für 24 ± 3 h zwischen 34 °C und 38 °C inkubiert.

9 Durchführung

9.1 Anfertigung von Zellsuspension oder DNS

Anhand eines Impfdrahts oder einer sterilen Impföse (6.2) wird (ein Teil einer) Kolonie bestimmt und in 100 µl Kochsalzlösung (0,85 % w/v, A.3) oder in 100 µl geeignetem PCR-Wasser suspendiert.

Mischung zur Homogenisierung einer Suspension.

Je nach spezifischem PCR-Test wird ein Aliquot von 2 µl oder 2,5 µl der bakteriellen Zellsuspension verwendet (siehe Tabelle B.2, Tabelle C.2, Tabelle D.2, Tabelle D.3 oder Tabelle D.4).

ANMERKUNG Es ist auch möglich, eine geeignete DNS-Extraktion für den PCR-Test zu verwenden. Für eine DNS-Extraktion kann z. B. eine thermische Zellyse oder ein anderes geeignetes Extraktionsverfahren verwendet werden. Wenn als zuverlässig erwiesen, können für die DNS-Extraktion auch handelsübliche Kits entsprechend der Anweisung des Herstellers verwendet werden.

9.2 PCR-Amplifikation und Nachweis

9.2.1 Allgemeines

Für eine probenbasierte Multiplex-Real-time-PCR, Multiplex-PCR mit darauffolgendem Agarosegel-Elektrophorese-Nachweis des Amplifikationsprodukts oder Einzelziel-PCR mit darauffolgendem Agarosegel-Elektrophorese-Nachweis können verschiedene Protokolle verwendet werden.

Ein Beispiel für eine probenbasierte Multiplex-Real-time-PCR ist in Anhang B aufgeführt.

Ein Beispiel für eine Agarosegel-basierte Multiplex-PCR ist in Anhang C aufgeführt.

Ein Beispiel für eine Agarosegel-basierte Einzelziel-PCR ist in Anhang D aufgeführt.

Für die (Real-time-)PCR-Amplifikation sind die Anforderungen, wie in ISO 22174 und ISO 20838 festgelegt, zu befolgen.

9.2.2 PCR-Kontrollen

Es sind (Prozess-)Kontrollen für die PCR-Tests nach ISO 22174 zu verwenden.

Für die Real-time-PCR (Anhang B) und die Einzelziel-PCR (Anhang D) müssen auch interne Amplifikationskontrollen verwendet werden, da alle Ziele negativ sein könnten. Da die Multiplex-PCR (Anhang C) immer zu einem PCR-Fragment (1 000 bp oder 250 bp) führt, erfordert dieses Verfahren keine interne Amplifikationskontrolle.

10 Darstellung der Ergebnisse

Die erzielten Ergebnisse, einschließlich der in ISO 22174 festgelegten Kontrollen, sollten eindeutig sein, da die PCR andernfalls wiederholt werden muss.

Das Prüfergebnis wird entweder:

- a) positiv sein, wenn ein spezifisches PCR-Produkt nachgewiesen wurde und alle Kontrollen die erwarteten Ergebnisse zeigen, oder
- b) innerhalb der Nachweisgrenzen negativ sein, wenn ein spezifisches PCR-Produkt nicht nachgewiesen wurde, und Kontrollen die erwarteten Ergebnisse zeigen.

Identifiziert der PCR-Test die Isolate als monophasisches *Salmonella* Typhimurium, erfolgt die Übermittlung der Ergebnisse vorzugsweise durch Angabe der bestimmten Antigenformel.

Es ist möglich, dass ein Isolat phänotypisch als monophasisches *Salmonella* Typhimurium identifiziert wird, aber genotypisch (mit PCR) als biphasisches *Salmonella* Typhimurium. Das kann dadurch verursacht sein, dass die Gene vorhanden sind, aber phänotypisch nicht exprimiert werden. Zur Identifizierung dieser Isolate haben die PCR-Ergebnisse Vorrang gegenüber den Ergebnissen des Serum-Agglutinationstests.

11 Leistungsmerkmale des Verfahrens

11.1 Validierung nach ISO 17468

Die in Anhang B, Anhang C und Anhang D beschriebenen PCR-Verfahren wurden nach ISO 17468 validiert. Alle relevanten Daten, die in Schritt 1 bis Schritt 5 von ISO 17468 gewonnen wurden sowie die Ergebnisse des Ringversuchs (Schritt 6 in ISO 17468) wurden in [6] berichtet.

Die Leistungsmerkmale der drei PCR-Verfahren (Inklusivität und Exklusivität) wurden in einer Studie zur Verfahrensbewertung (beschrieben in 11.2.1) und in einem Ringversuch (beschrieben in 11.2.2) bestimmt.

11.2 Leistungsmerkmale

11.2.1 Studie zur Verfahrensbewertung

Die drei in Anhang B, Anhang C, und Anhang D beschriebenen PCR-Tests wurden in einer Studie zur Verfahrensbewertung getestet, indem 172 verschiedene Stämme (Ziel- und Nicht-Ziel-Stämme) in zwei unterschiedlichen Laboren isoliert von verschiedenen Quellen (Lebensmittelerzeugnisse, Tiere, Futtermittel, Primärproduktionsproben und Menschen) untersucht wurden. Zum Erproben der Inklusivität und Exklusivität wurden die durch Objektträgeragglutination ermittelten Typisierungsergebnisse von *Salmonella* mit den durch das PCR-Verfahren ermittelten Typisierungsergebnissen verglichen.

Alle Daten sind in Anhang E angegebenen und weitere Informationen sind in Verweisung [6] zu finden.

Je nach dem bestimmungsgemäßen spezifischen Ziel, für das der PCR-Test angewendet wird, und seine bewertete Leistung, kann unter Umständen nur monophasisches *Salmonella* Typhimurium als Zielstamm betrachtet werden (und daher Teil der Untersuchung zum Maß der Inklusivität sein) oder auch (biphasisches) *Salmonella* Typhimurium.

Besteht das bestimmungsgemäße Ziel darin, zu ermitteln, ob der untersuchte Stamm die monophasische Variante von *Salmonella* Typhimurium ist und nicht die monophasische Variante von einem anderen *Salmonella* non-Typhimurium, können monophasisches *Salmonella* Typhimurium sowie (biphasisches) *Salmonella* Typhimurium als Zielstämme betrachtet werden und die drei in Anhang B, Anhang C und Anhang D beschriebenen PCR-Tests eine gleichermaßen gute Leistung erzielen (Tabelle E.1).

Soll identifiziert werden, ob der untersuchte Stamm entweder monophasisches *Salmonella* Typhimurium oder (biphasisches) *Salmonella* Typhimurium ist, sollte *Salmonella* Typhimurium als Nicht-Zielstamm betrachtet werden. Hierfür kann die gelbasierte Multiplex-PCR (Anhang C) für einige Stämme weniger spezifisch sein als die zwei anderen PCR-Tests (Tabelle E.2), da dieser Test für die Unterscheidung von biphasischem und monophasischem *Salmonella* Typhimurium weniger geeignet ist.

11.2.2 Ringversuch

Die Leistungsmerkmale von jedem PCR-Verfahren (siehe Anhang B, Anhang C und Anhang D) wurden in einem Ringversuch bestimmt (Schritt 6 in ISO 17468), um die Inklusivität und Exklusivität in den drei Verfahren nach den in ISO 16140-6 beschriebenen Verfahren zu bestimmen. Einzelheiten über den Ringversuch und eine Zusammenfassung der Daten sind in E.2 angegeben.

Eine Zusammenfassung der Daten zur Inklusivität und Exklusivität ist in Tabelle E.4 aufgeführt.

In dieser Untersuchung zum Maß der Inklusivität wurden durch das Verfahren zu bestimmende reine Zielstämme getestet. Für diesen Ringversuch wurde monophasisches *Salmonella* Typhimurium als einziger Zielstamm betrachtet.

In dieser Untersuchung zur Exklusivität wurden Nicht-Zielstämme getestet, deren Bestimmung durch das Verfahren nicht erwartet wurde, die aber potentiell kreuzreaktiv sein können. Für diesen Ringversuch wurden andere *Salmonella*-Serovare als monophasisches *Salmonella* Typhimurium, einschließlich (biphasischem) *Salmonella* Typhimurium und andere *Enterobacteriaceae* als Nicht-Zielstämme betrachtet.

12 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss mindestens Folgendes enthalten:

- das angewendete Untersuchungsverfahren mit Verweisung auf dieses Dokument, d. h. ISO/TS 6579-4;
- alle in diesem Dokument nicht festgelegten oder als optional angesehenen Betriebsbedingungen, einschließlich Einzelheiten zu allen Vorkommnissen, die das (die) Untersuchungsergebnis(se) beeinflussen haben könnten;

- sämtliche Abweichungen von diesem Dokument;
- sämtliche zur vollständigen Identifizierung der Probe notwendigen Angaben;
- das (die) erhaltene(n) Untersuchungsergebnis(se);
- das Prüfdatum.

13 Qualitätssicherung

Das Labor sollte ein klar festgelegtes Qualitätslenkungssystem haben, um sicherzustellen, dass Geräte, Reagenzien und Techniken für das Verfahren geeignet sind. Die Verwendung von Positivkontrollen, Negativkontrollen und Blindproben ist Teil des Verfahrens. Die Leistungsprüfung von Nährmedien ist in A.4 festgelegt und in ISO 11133 beschrieben.

Anhang A (informativ)

Nährmedien und Reagenzien

A.1 Allgemeines

Die allgemeinen Anforderungen aus ISO 11133 gelten für die Herstellung und Leistungsprüfung der in diesem Anhang beschriebenen Nährmedien. Falls Nährmedien oder Reagenzien aus vollständigen Trockenmedien/Reagenzien hergestellt werden oder falls gebrauchsfertige Medien/Reagenzien verwendet werden, sind die Anweisungen des Herstellers zu Herstellung, Lagerungsbedingungen, Verfallsdatum und Verwendung zu befolgen.

Die Haltbarkeit der in diesem Anhang angeführten Medien wurde in einigen Untersuchungen aufgezeigt. Der Anwender muss diese unter den eigenen Lagerungsbedingungen verifizieren (wie in ISO 11133 festgelegt).

Die Leistungsprüfung der Nährmedien ist in A.4 beschrieben.

A.2 Nähragar (Beispiel für ein nicht selektives Medium)

A.2.1 Zusammensetzung

Fleischextrakt	3,0 g
Pepton ^a	5,0 g
Natriumchlorid (NaCl) (wahlfrei) (CAS- ® ^c Nr. 7647-14-5)	5,0 g
Agar	9,0 g bis 18,0 g ^b
Wasser	1 000 ml

^a Zum Beispiel enzymatisch verdautes Casein.

^b In Abhängigkeit von den Geleigenschaften des Agars.

^c Chemical Abstracts Service (CAS), Registrierungsnummer ® ist eine Abteilung der American Chemical Society (ACS). Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn nachgewiesen werden kann, dass sie zu denselben Ergebnissen führen.

A.2.2 Herstellung

Die Bestandteile oder das vollständige Trockenmedium werden unter Erwärmen und häufigem Rühren in Wasser gelöst.

Der pH-Wert wird bei Bedarf so eingestellt, dass er nach dem Sterilisieren $7,0 \pm 0,2$ bei 20 °C bis 25 °C beträgt.

Das Nährmedium wird in Röhrchen oder Kolben mit geeignetem Fassungsvermögen überführt.

Die Kolben werden 15 min in dem auf 121 °C eingestellten Autoklaven (6.14) sterilisiert.

A.2.3 Herstellung der Nähragarplatten

Das Medium wird im Wasserbad (6.3) auf 47 °C bis 50 °C abgekühlt, durchmischt und in sterile Petrischalen mit einem Durchmesser von 90 mm (6.10) gegossen. Die Platten werden bis zum Verfestigen des Agars stehen gelassen.

Unmittelbar vor der Verwendung werden die Agarplatten vorsichtig (vorzugsweise ohne Deckel und mit der Agaroberfläche nach unten) in dem auf 25 °C bis 50 °C eingestellten Wärmeschrank (6.5) getrocknet, bis die Agaroberfläche trocken ist.

Die gegossenen Platten werden bei 5 °C (6.4) bis zu vier Wochen vor Austrocknung geschützt gelagert.

A.3 Kochsalzlösung (0,85 % w/v)

A.3.1 Zusammensetzung

Natriumchlorid (NaCl)	(CAS Nr. 7647-14-5)	8,5 g
Wasser		1 000 ml

A.3.2 Herstellung

Das Natriumchlorid wird in Wasser gelöst.

Der pH-Wert wird bei Bedarf so eingestellt, dass er nach dem Sterilisieren $7,0 \pm 0,2$ bei 20 °C bis 25 °C beträgt.

Die Lösung wird in Kulturkolben oder -röhrchen von geeignetem Fassungsvermögen abgefüllt, so dass die für die Untersuchung notwendigen Portionen erhalten werden.

Die Kolben werden 15 min in dem auf 121 °C eingestellten Autoklaven (6.14) sterilisiert.

Die Lösung wird in geschlossenen Kolben/Röhrchen bis zu sechs Monate bei 5 °C (6.4) aufbewahrt.

A.4 Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien

Die Definitionen von Selektivität und Produktivität sind in ISO 11133 festgelegt. Im Allgemeinen sind die Vorgehensweisen für die Leistungsprüfung nach ISO 11133 einzuhalten, einschließlich der Inokulum-Gehalte für die Ziel- und Nichtzielorganismen (ISO 11133, 5.4). In Tabelle A.1 sind Einzelheiten zu den in diesem Dokument festgelegten Kontrollstämmen, die für die Leistungsprüfung von Nährmedien zu verwenden sind, angegeben.

Tabelle A.1 — Leistungsprüfung zur Qualitätssicherung der Nährmedien

Medium	Funktion	Inkubation	Kontrollstämme	WDCM-Nummern^a	Kriterien^b
Nähragar	Produktivität	24 h ± 3 h/34 °C bis 38 °C	<i>Salmonella</i> Typhimurium ^{c d} <i>Salmonella</i> Enteritidis ^{c d}	00031 00030	gutes Wachstum
^a Bezüglich Informationen zu den Stammmnummern in Kultursammlungen und den jeweiligen Kontaktdaten siehe Katalog der Referenzstämme unter www.wfcc.info ; WDCM: World Data Centre for Microorganisms. ^b Das Wachstum wird kategorisiert als: 0 – kein Wachstum; 1 – schwaches Wachstum (teilweise Hemmung); 2 – gutes Wachstum (siehe ISO 11133). ^c Einige nationale Beschränkungen und Vorschriften können die Verwendung eines anderen Serovars erfordern. Bezüglich der Wahl von <i>Salmonella</i> -Serovaren sind die nationalen Anforderungen heranzuziehen. ^d Freie Wahl des Stammes; einer der Stämme ist als Minimum zu verwenden.					

Anhang B (informativ)

Probenbasierter Multiplex-Real-time-PCR-Test zur Identifizierung von monophasischem *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-)

B.1 Allgemeines

Dieser Anhang beschreibt ein probenbasiertes Multiplex-Real-time-PCR-Verfahren, das auf einer 5'-Nuklease-Technologie zur Identifizierung der monophasischen Variante von *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-) und der Differenzierung von anderen monophasischen *Salmonella* non-Typhimurium-Serovaren beruht. Es ist auf die folgenden genetischen Sequenzen ausgerichtet:

- Verbindung zwischen *fliA* und Insertionssequenz IS200 (vorhanden in *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:1,2) und monophasischem *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-));
- Verbindung zwischen *fljB* und *hin* (vorhanden in Isolaten, die das zweite H-Phasen-Antigen exprimieren);
- Verbindung zwischen *hin* und *iroB* (vorhanden in Isolaten, die das zweite H-Phasen-Antigen exprimieren).

Bei einer Expression des zweiten H-Phase-Antigens, sollten beide Amplifikationsprodukte, *fljB-hin* sowie *hin-iroB*, nachgewiesen werden. Wenn eins der beiden Produkte nicht nachgewiesen werden kann, wird die Expression des zweiten H-Phase-Antigens unterbrochen.

Dieses probenbasierte Multiplex-Real-time-PCR enthält zusätzlich eine heterologe interne Amplifikationskontrolle (IAC), die auf dem Plasmid pUC18/19 basiert. Durch Real-time-PCR wird ein Fragment, das von M13pm18 bis zu Sequenzen von pBR322 reicht, amplifiziert. Diese Sequenz kommt natürlicherweise nicht vor.

ANMERKUNG Es kann eine andere IAC mit ihren spezifischen Primern und Sonden verwendet werden, wenn sie gleichwertige Ergebnisse liefert.

B.2 Durchführung

B.2.1 Kurzbeschreibung

Drei spezifische genetische Sequenzen und eine Sequenz einer IAC werden amplifiziert und durch ein probenbasiertes Multiplex-Real-time-PCR-Verfahren nachgewiesen, das auf einer 5'-Nuklease-Technologie basiert.

B.2.2 Reagenzien für PCR

B.2.2.1 Allgemeines

Siehe ISO 22174 und ISO 20838.

B.2.2.2 Primer und Sonden

Primer und Sonden wurden 2015 von Maurischat et al. veröffentlicht. [5] Die Sequenzen sind in Tabelle B.1 angegeben.

Tabelle B.1 — Sequenzen der Primer und Sonden

Ziel-Sequenz	Primer-/Sondenname	Primer-/Sondensequenz (5'-3')	Ampli-kongröße (bp)
<i>fliA-IS200</i>	fliA-IS200F	CAT TAC ACC TTC AGC GGT AT	254
	fliA-IS200R	CTG GTA AGA GAG CCT TAT AGG	
	fliA-IS200-Probe2	FAM-CGG CAT GAT TAT CCG TTT CTA CAG AGG-BHQ1 ^a	
<i>fljB-hin</i>	fljB-hinF	TGG TGC TGT TAG CAG AC	297
	fljB-hinR	TCA ACA CTA ACA GTC TGT CG	
	fljB-hin-Probe	YY-AAC CGC CAG TTC ACG CAC-BHQ2 ^b	
<i>hin-iroB</i>	hin-iroBF	GTG TGG CAT AAA TAA ACC GA	274
	hin-iroBR	AGG CTT ACC TGT GTC ATC CA	
	hin-iroB-Probe	ROX-TAA CGC GCT CAC GAT AAG GC-BHQ2 ^c	
IAC ^d	IAC-FW	GTC GGG AAA CCT GTC G	207
	IAC-RV	GCT CAC ATG TTC TTT CCT GC	
	IAC-Probe	Cy5-CGG GGA GAG GCG GTT-BHQ3 ^e	
ANMERKUNG Es können andere geeignete Fluorophore und Quencher verwendet werden.			
^a FAM: 6 Carboxyfluorescein, BHQ1: Black Hole Quencher 1™			
^b YY: Yakima Yellow™, BHQ2: Black Hole Quencher 2™			
^c ROX: Carboxy-X-rhodamine™, BHQ2: Black Hole Quencher 2™			
^d IAC: interne Amplifikationskontrolle			
^e Cy5: Cyanine 5 ®, BHQ3: Black Hole Quencher 3™			

B.2.3 Aufbau von Real-time-PCR

B.2.3.1 Reaktionsaufbau

Das PCR-Gesamtvolumen beträgt 25 µl je PCR-Reaktion. Die Reagenzien für die Herstellung der Reaktionsmischung sind in Tabelle B.2 aufgeführt.

Tabelle B.2 — Herstellung der Reaktionsmischung

Reagenzien (Stammkonzentration)	Endkonzentration	Volumen je Reaktion (µl) ^a
10×PCR-Puffer, enthält kein MgCl ₂	1×	2,5
dNTP-Mischung (jeweils 2 mmol/l)	jeweils 200 µmol/l	2,5
Magnesiumchlorid (50 mmol/l)	2,5 mmol/l	1,25
<i>fliA-IS200F</i> (20 pmol/µl)	0,4 pmol/µl	0,5
<i>fliA-IS200R</i> (20 pmol/µl)	0,4 pmol/µl	0,5
<i>fljB-hinF</i> (20 pmol/µl)	0,4 pmol/µl	0,5
<i>fljB-hinR</i> (20 pmol/µl)	0,4 pmol/µl	0,5
<i>hin-iroBF</i> (20 pmol/µl)	0,4 pmol/µl	0,5
<i>hin-iroBR</i> (20 pmol/µl)	0,4 pmol/µl	0,5
IAC-FW (20 pmol/µl)	0,4 pmol/µl	0,5

Tabelle B.2 (fortgesetzt)

Reagenzien (Stammkonzentration)	Endkonzentration	Volumen je Reaktion (µl) ^a
IAC-RV (20 pmol/µl)	0,4 pmol/µl	0,5
fla-IS200-probe2 (5'FAM-3'BHQ1) (5 pmol/µl)	0,125 pmol/µl	0,625
fljB-hin-Probe (5'YY-3'BHQ2) (10 pmol/µl)	0,25 pmol/µl	0,625
hin-iroB-probe (5'ROX-3'BHQ2) (10 pmol/µl)	0,25 pmol/µl	0,625
IAC-probe (5'Cy5-3'BHQ3) (10 pmol/µl)	0,25 pmol/µl	0,625
Taq-Polymerase ^b	2 U	0,2
IAC-pUC19DNA	etwa 10 ⁵ Kopien	1,0
Zellsuspension oder DNS-Extrakt (9.1)		2,5
Geeignetes PCR-Wasser	auf 25 µl einstellen	8,55
ANMERKUNG Für IAC kann auch pUC 18 verwendet werden. 1 fg pUC 18/19 entspricht etwa 3,4 × 10 ² -Kopien.		
^a Das Volumen je Reaktion hängt von der Konzentration der Reagenzien in der Stammlösung ab und wird durch die Endkonzentration bestimmt.		
^b Leistungsmerkmale dieses Tests wurden mit der handelsüblich verfügbaren Platinum™ Taq-Polymerase und 10×PCR-Puffer (Invitrogen) getestet. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung des Anwenders dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte können verwendet werden, falls sie nachweisbar zu gleichwertigen Ergebnissen führen.		

B.2.3.2 PCR-Kontrollen

B.2.3.2.1 Allgemeines

Siehe ISO 22174.

B.2.3.2.2 Negative PCR-Kontrolle

DNS-freies Wasser wird als Negativkontrolle verwendet, siehe ISO 22174.

B.2.3.2.3 Positive PCR-Kontrolle

Eine Zellsuspension von *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:1,2) oder eine Lösung, die eine definierte, ausreichende Menge und/oder Anzahl an Kopien der Ziel-DNS von *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:1,2) enthält, wird für eine positive Kontrolle verwendet (Herstellung siehe 9.1).

B.2.3.3 Temperatur-Zeit-Programm

Es werden das Temperatur-Zeit-Programm und die in Tabelle B.3 angegebene Anzahl der Zyklen der Reaktionsmischung von 25 µl sowie die PCR-Kontrollen angewendet.

Tabelle B.3 — Temperatur-Zeit-Programm

Zyklusschritt	Temperatur ^a und Zeit	Anzahl der Zyklen
Aktivierung/initialer Denaturierung	95 °C für 2 min ^b	
Denaturierung	95 °C für 15 s	40 Zyklen
Amplifikation	61 °C für 1 min	
^a Die angegebenen Temperaturen sind die Temperaturen, die effektiv durch den Thermocycler erreicht werden sollten. Sie stimmen nicht notwendigerweise mit den programmierten Temperaturen überein. Wenn der Thermocycler eine Abweichung nach der Kalibrierung zeigt, ist diese Abweichung zu korrigieren.		
^b Die Aktivierungszeit hängt von der verwendeten <i>Taq</i> -Polymerase ab.		

B.3 Auswertung der PCR-Ergebnisse

Die PCR-Ergebnisse müssen wie folgt interpretiert werden:

- a) Positive Reaktion: Das Fluoreszenzsignal steigt während der Amplifikation exponentiell an und überschreitet den Schwellenwert-Zyklus-Schnittpunkt.
- b) Negative Reaktion: Das Fluoreszenzsignal überschreitet den Schwellenwert-Zyklus-Schnittpunkt nicht.

Der Quantifizierungszyklus (C_q)-Wert, oder Schwellenwert-Zyklus (C_t)-Wert, hängt von dem für den Test verwendeten Thermocyclermode und der Analysesoftware ab und muss für den eigenen Thermocycler des Anwenders festgelegt werden. Eine positive Probe erzeugt eine typische Amplifikationskurve, die mindestens die exponentielle Phase zeigt (siehe ISO 22119:2011).

Die positive (Prozess-) Kontrolle (z. B. ein Isolat eines biphasischen *Salmonella* Typhimurium; siehe B.2.3.2.3) kann dabei helfen, die Amplifikationskurve auszuwerten und den Schwellenwert einzustellen, um den C_t -Wert der Zielsequenz dieses untersuchten Isolats festzulegen. Ist ein Isolat positiv für eine andere Zielsequenz (siehe Tabelle B.4), ist zudem zu erwarten, dass der C_t -Wert der verschiedenen Ziele, ohne die IAC, in derselben Größenordnung ist. Weitere Informationen und Leitlinien zur Auswertung von Real-time-PCR-Ergebnissen können ISO 22174 entnommen werden.

Eine Probe wird als positiv für monophasisches *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-) gewertet, wenn die entsprechende Reaktion *fliA*-IS200 positiv ist und nur einer oder keiner der anderen zwei *fljB*-*hin* und *hin*-*iroB* positiv ist. Die IAC kann entweder positiv oder negativ sein (siehe Tabelle B.4).

Eine Probe wird als positiv für *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:1,2) gewertet, wenn die entsprechende Reaktion *fliA*-IS200 und zusätzlich *fljB*-*hin* sowie *hin*-*iroB* positiv ist. Die IAC kann entweder positiv oder negativ sein (siehe Tabelle B.4).

Eine Probe wird als negativ für *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:1,2) und monophasisches *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-) gewertet, wenn die entsprechende Reaktion *fliA*-IS200 negativ ist, ungeachtet von den Ergebnissen von *fljB*-*hin* und *hin*-*iroB*. Die IAC muss positiv sein, wenn alle Ergebnisse negativ sind (siehe Tabelle B.4). Wenn alle Ergebnisse, einschließlich IAC, negativ sind, ist die Reaktion gescheitert und der Vorgang sollte für diese Probe wiederholt werden.

Tabelle B.4 — Auswertung der PCR-Ergebnisse

Ziel-Sequenz	1,4[5],12:i:-	1,4[5],12:i:-	1,4[5],12:i:-	1,4[5],12:i:1,2	Andere Serovare
<i>fliA</i> -IS200	+	+	+	+	—
<i>fljB</i> - <i>hin</i>	—	+	—	+	+ oder —

Tabelle B.4 (*fortgesetzt*)

Ziel-Sequenz	<u>1</u>,4[5],12:i:-	<u>1</u>,4[5],12:i:-	<u>1</u>,4[5],12:i:-	<u>1</u>,4[5],12:i:1,2	Andere Serovare
<i>hin-iroB</i>	—	—	+	+	+ oder –
IAC	+ oder –	+ oder –	+ oder –	+ oder –	+ oder – ^a
^a Wenn alle Ziele negativ sind, muss die IAC positiv sein.					

Anhang C (informativ)

Agarosegel-basierter Multiplex-Real-time-PCR-Test zur Identifizierung von monophasischem *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-)

C.1 Allgemeines

Dieser Anhang beschreibt ein Agarosegel-basiertes Multiplex-Real-time-PCR-Verfahren zur Identifizierung der monophasischen Variante von *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-) und Differenzierung von anderen monophasischen *Salmonella* non-Typhimurium-Serovaren. Es ist auf die folgenden genetischen Sequenzen ausgerichtet:

- *fliB-fliA* intergenische Region des Flagellengen Clusters. Bei *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:1,2) und monophasischem *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-) wird ein 1 000 bp Produkt amplifiziert. Für andere *Salmonella*-Serovare, ungeachtet des ersten H-Phase-Antigens, wird ein 250 bp PCR-Produkt amplifiziert. Die *fliB-fliA* intergenische Region dieser Serovare hat kein IS200 Element.
- *fljB* (vorhanden in Isolaten, die das zweite H-Phasen-Antigen exprimieren). Das PCR-Produkt hat eine Größe von 1 389 bp.

Bei *Salmonella* Typhimurium werden zwei PCR-Produkte mit einer Größe von 1 000 bp und 1 389 bp amplifiziert. Für monophasisches *Salmonella* Typhimurium (1,4[5],12:i:-) wird nur ein PCR-Produkt mit einer Größe von 1 000 bp generiert. Für andere Serovare (einschließlich derjenigen, die das H:i-Antigen teilen), generiert PCR ein 250 bp-Amplikon. Ein 1 389 bp Amplikon kann oder kann nicht generiert werden.

ANMERKUNG Statt Agarosegel-Elektrophorese kann auch Kapillarelektrophorese zum Trennen von amplifizierten Produkten genutzt werden, wenn nachgewiesen werden kann, dass es zu gleichwertigen Ergebnissen führt.

C.2 Durchführung

C.2.1 Kurzbeschreibung

Spezifische genetische Sequenzen werden durch Multiplex-PCR amplifiziert. Amplifizierte Produkte werden durch Agarosegel-Elektrophorese getrennt und durch die Größe festgelegt.

C.2.2 Reagenzien für PCR

C.2.2.1 Allgemeines

Siehe ISO 20838.

C.2.2.2 Primer

Primer wurden von Tennant et al. (2010) [7] und EFSA (2010) veröffentlicht. [3] Die Ergebnisse sind in Tabelle C.1 aufgeführt.

Tabelle C.1 — Sequenzen der Primer

Ziel-Sequenz	Primer-Name	Primersequenz (5' - 3')	Amplikongröße (bp)
<i>fliA-fliB</i>	FFLIB	CTG GCG ACG ATC TGT CGA TG	1 000 oder
	RFLIA	GCG GTA TAC AGT GAA TTC AC	250