

DIN EN ISO 15216-1



ICS 07.100.30

Ersatz für
DIN CEN ISO/TS 15216-1
(DIN SPEC 10051-1):2013-08

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Horizontales Verfahren zur Bestimmung von Hepatitis-A-Virus und
Norovirus mittels Real-time-RT-PCR –
Teil 1: Verfahren zur Quantifizierung (ISO 15216-1:2017);
Deutsche Fassung EN ISO 15216-1:2017**

Microbiology of the food chain –
Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time
RT-PCR –
Part 1: Method for quantification (ISO 15216-1:2017);
German version EN ISO 15216-1:2017

Microbiologie dans la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus par la technique
RT-PCR en temps réel –
Partie 1: Méthode de quantification (ISO 15216-1:2017);
Version allemande EN ISO 15216-1:2017

Gesamtumfang 61 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 15216-1:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird, in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ erarbeitet.

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

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

ISO 5725-2	siehe DIN ISO 5725-2
ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 17468	siehe DIN EN ISO 17468
ISO 20838	siehe DIN EN ISO 20838
ISO 22119	siehe DIN EN ISO 22119
ISO 22174	siehe DIN EN ISO 22174

Änderungen:

Gegenüber DIN CEN ISO/TS 15216-1 (DIN SPEC 10051-1):2013-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Verwendung von linearen dsDNA-Molekülen für die Quantifizierung wird vorgeschrieben;
- b) die Verwendung eines geeigneten Puffers für die vorgeschriebene Verdünnung von Kontrollmaterialien;
- c) Änderung des Verfahrens zur Erzeugung von Prozesskontrollvirus-RNA für die Standardkurve;
- d) Hinzufügen von Haltepunkten mit festgelegter Temperatur und Zeitparametern in den Extraktionsverfahren;
- e) Änderung an der Terminologie von Amplifikationseffizienz zu Inhibition der RT-PCR;
- f) Hinzufügen von zusätzlichen Real-time-RT-PCRs für negative Kontrollen;
- g) Hinzufügen von Präzisionsdaten und Ergebnissen eines Ringversuchs.

Frühere Ausgaben

DIN CEN ISO/TS 15216-1 (DIN SPEC 10051-1): 2013-08

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

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

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, *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*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

— Leerseite —

Deutsche Fassung

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette —
Horizontales Verfahren zur Bestimmung von
Hepatitis-A-Virus und Norovirus mittels Real-time-RT-PCR —
Teil 1: Verfahren zur Quantifizierung
(ISO 15216-1:2017)**

Microbiology of the food chain —
Horizontal method for determination of
hepatitis A virus and norovirus using
real-time RT-PCR —
Part 1: Method for quantification
(ISO 15216-1:2017)

Microbiologie dans la chaîne alimentaire —
Méthode horizontale pour la recherche des
virus de l'hépatite A et norovirus par la technique
RT-PCR en temps réel —
Partie 1: Méthode de quantification
(ISO 15216-1:2017)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 23. Februar 2017 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	10
4.1 Virusgewinnung	10
4.2 RNA-Extraktion	10
4.3 Real-time-RT-PCR (Real-time-Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion)	10
4.4 Kontrollmaterialien	11
4.4.1 Prozesskontrollvirus	11
4.4.2 Doppelsträngige DNA-Kontrolle (dsDNA-Kontrolle)	11
4.4.3 EC-RNA-Kontrolle	11
4.5 Untersuchungsergebnisse	12
5 Reagenzien	12
5.1 Allgemeines	12
5.2 Reagenzien, die im Lieferzustand verwendet werden	12
5.3 Herstellende Reagenzien	13
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien	14
7 Probenahme	16
8 Durchführung	16
8.1 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien	16
8.2 Virusgewinnung	16
8.2.1 Virusmaterial für die Prozesskontrolle	16
8.2.2 Negative Prozesskontrolle	16
8.2.3 Lebensmitteloberflächen	17
8.2.4 Weiches Obst, Blatt-, Stängel- und Zwiebelgemüse	17
8.2.5 In Flaschen abgefülltes Trinkwasser	18
8.2.6 Zweischalige Weichtiere (en: bivalve molluscan shellfish, BMS)	19
8.3 RNA-Extraktion	19
8.4 Real-time-RT-PCR	20
8.4.1 Allgemeine Anforderungen	20
8.4.2 Analyse mit Real-time-RT-PCR	20
9 Auswertung der Ergebnisse	23
9.1 Allgemeines	23
9.2 Erstellen von Standardkurven	23
9.3 Berechnung der RT-PCR-Inhibition	23
9.4 Berechnung der Extraktionseffizienz	24
9.5 Proben-Quantifizierung	25
10 Angabe der Ergebnisse	26
11 Präzision des Verfahrens	27

11.1	Ringversuch.....	27
11.2	Wiederholpräzision.....	27
11.3	Vergleichgrenze	27
12	Untersuchungsbericht	28
Anhang A (normativ) Schematische Darstellung des Verfahrens		29
Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung von Reagenzien und Pufferlösungen		30
Anhang C (informativ) Real-time-RT-PCR-Mastermixe und Parameter für die Durchführung der PCR.....		33
Anhang D (informativ) Real-time-RT-PCR-Primer und -Hydrolysesonden für den Nachweis von HAV, Norovirus GI und GII sowie Mengovirus (Prozesskontrolle).....		34
Anhang E (informativ) Vermehrung des Mengovirus-Stammes MC ₀ zur Verwendung als Prozesskontrolle		37
Anhang F (informativ) RNA-Extraktion unter Anwendung des NucliSENS®-Systems.....		38
Anhang G (informativ) Herstellung der doppelsträngigen Kontroll-DNA-Stammlösungen.....		40
Anhang H (informativ) Herstellung der EC-RNA-Stammlösungen		43
Anhang I (informativ) Beispielhafte Plattenbelegung.....		45
Anhang J (informativ) Untersuchungen zur Methodvalidierung und Leistungsmerkmale des Verfahrens		46
Literaturhinweise.....		57

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 15216-1:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird, in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ erarbeitet.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis September 2017 und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis September 2017 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt CEN ISO/TS 15216-1:2013.

Dieses Dokument wurde unter einem Normungsauftrag erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 15216-1:2017 wurde von CEN als EN ISO 15216-1:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, 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 empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung zur freiwilligen Natur von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Europäischen Komitee für Normung (CEN), dem Technischen Komitee CEN/TC 275, *Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren*, in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung über technische Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erstellt.

Diese erste Ausgabe annulliert und ersetzt ISO/TS 15216-1:2013, die mit den folgenden Änderungen technisch überarbeitet wurde:

- Verwendung von linearen dsDNA-Molekülen für die vorgeschriebene Quantifizierung;
- Verwendung eines geeigneten Puffers für die vorgeschriebene Verdünnung von Kontrollmaterialien;
- Änderung des Verfahrens zur Erzeugung von Prozesskontrollvirus-RNA für die Standardkurve;
- Hinzufügen von Haltepunkten mit festgelegten Temperatur- und Zeitparametern in den Extraktionsverfahren;
- Änderung der Terminologie von Amplifikationseffizienz zu Inhibition der RT-PCR;
- Hinzufügen von zusätzlichen Real-time-RT-PCRs für negative Kontrollen;
- Hinzufügen von Präzisionsdaten und Ergebnissen eines Ringversuchs.

Eine Liste aller Teile von ISO 15216 ist auf der ISO-Internetseite zu finden.

Einleitung

Hepatitis-A-Viren (HAV) und Noroviren sind wichtige Erreger von lebensmittelbedingten Viruserkrankungen beim Menschen. Bislang gibt es keine Routineverfahren zur Kultivierung von Noroviren und die Kultivierungsverfahren von HAV eignen sich nicht zur Routineanwendung bei Lebensmittelmatrixen. Der Nachweis beruht daher auf molekularbiologischen Verfahren unter Anwendung der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Da viele Lebensmittelmatrixen Substanzen enthalten, die sich hemmend auf die RT-PCR auswirken, ist es notwendig, ein Extraktionsverfahren anzuwenden, mit dem hochreine gebrauchstaugliche RNA-Extrakte erhalten werden. Von Lebensmitteloberflächen werden die Viren mit einem Tupfer abgenommen. Bei weichem Obst, Blatt-, Stängel- und Zwiebelgemüse werden die Viren nach Ablösen von der Lebensmittelmatrix mittels PEG/NaCl-Fällung gewonnen. Bei in Flaschen abgefülltem Trinkwasser erfolgt eine Adsorption und Elution der Viren unter Verwendung positiv geladener Membranen und anschließender Anreicherung mittels Ultrafiltration. Bei zweischaligen Weichtieren (Muscheln; en: bivalve molluscan shellfish, BMS) werden die Viren aus dem Gewebe der Verdauungsdrüsen durch Behandlung mit einer Proteinase K-Lösung isoliert. Bei allen Matrixen, die nicht in diesem Dokument aufgeführt sind, ist es notwendig, dieses Verfahren zu validieren. Für sämtliche Matrixen wird ein einheitliches RNA-Extraktionsverfahren verwendet, das auf dem Aufschluss des Viruskapsids mittels chaotroper Reagenzien und anschließender Adsorption der RNA an eine Silica-Matrix beruht. Bei der Real-time-RT-PCR wird die Amplifikation während des Real-time-PCR-Zyklus durch Messung der Anregung von fluoreszenzmarkierten Molekülen sichtbar gemacht. Bei der Real-time-RT-PCR mit Hydrolysesonden wird eine sequenzspezifische, mit Fluoreszenzmarkern gekoppelte Nukleotidsonde verwendet, die ebenfalls eine simultane Bestätigung der Zieltemplates ermöglicht. Diese Modifikationen erhöhen Empfindlichkeit und Spezifität des Real-time-RT-PCR-Verfahrens und erübrigen zusätzliche Schritte zur Verifizierung des Amplifikationsergebnisses nach der Real-time-RT-PCR. Aufgrund der Komplexität des Verfahrens ist es notwendig, einen umfassenden Satz von Kontrollen mitzuführen. Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren ermöglicht die quantitative Bestimmung des Gehalts an Virus-RNA in der Untersuchungsprobe. Eine schematische Darstellung des Verfahrens ist in Anhang A gegeben.

Die im Vorwort aufgezählten wesentlichen Änderungen zu ISO/TS 15216-1:2013, die in diesem Dokument eingeführt werden, gelten als geringfügig (siehe ISO 17468).

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren für die quantitative Bestimmung des Gehalts an RNA von HAV und Noroviren der Genogruppen I (GI) und II (GII) in Untersuchungsproben von Lebensmitteln (weiches Obst, Blatt-, Stängel und Zwiebelgemüse, in Flaschen abgefülltes Trinkwasser, zweischalige Weichtiere (Muscheln)) oder Lebensmitteloberflächen fest. Nach der Freisetzung der Viren aus der Untersuchungsprobe wird die virale RNA durch Aufschluss mit Guanidinthiocyanat und Adsorption an Silica(-Partikeln) extrahiert. Die Zielsequenzen in der viralen RNA werden amplifiziert und mittels Real-time-RT-PCR detektiert.

Dieses Verfahren ist weder für den Nachweis der Zielviren in anderen Lebensmitteln (einschließlich zusammengesetzter Lebensmittel) oder anderen Matrices noch für den Nachweis anderer Viren in Lebensmitteln, auf Lebensmitteloberflächen oder anderen Matrices validiert.

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

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, *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 food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 22174, ISO 22119 und ISO 20838 und die folgenden Begriffe.

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

— IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>

— ISO Online Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

Lebensmittel

Substanz, die als Nahrungsmittel verwendet wird oder für die Verwendung als Nahrungsmittel zubereitet wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Für die Anwendung dieses Dokuments schließt diese Definition in Flaschen abgefülltes Trinkwasser ein.

3.2

Lebensmitteloberfläche

Oberfläche eines Lebensmittels, Oberfläche, auf der die Lebensmittelzubereitung erfolgt, oder mit Lebensmitteln in Berührung kommende Fläche

3.3

weiches Obst

kleines, essbares, steinloses Obst

BEISPIEL

Erdbeeren, Himbeeren oder Johannisbeeren

3.4

Blatt-, Stängel- und Zwiebelgemüse

Blätter, Stängel und Zwiebeln von Pflanzen, die als Gemüse verspeist werden

3.5

Hepatitis-A-Virus

HAV

zur Familie der *Picornaviridae* gehörendes Virus, das infektiöse Hepatitis verursacht

Anmerkung 1 zum Begriff: Aus genetischer Sicht kann HAV anhand der VP1/2A-Region in sechs Genotypen unterteilt werden (die Genotypen 1, 2 und 3 wurden beim Menschen gefunden, während die Genotypen 4, 5 und 6 simianen Ursprungs sind). Es gibt nur einen Serotyp.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Übertragung erfolgt fäkal-oral durch Mensch-zu-Mensch-Kontakt, über den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln, den Kontakt mit kontaminiertem Wasser bzw. kontaminierten Lebensmitteloberflächen oder den Kontakt mit kontaminierten Virusträgern. HAV wird von der Europäischen Union als biologisches Agens der Gruppe 2 und von den nationalen Gesundheitsinstituten der Vereinigten Staaten (en: United States National Institutes of Health) als human-ätiologisches Agens der Risikogruppe 2 eingestuft.

3.6

Norovirus

zur Familie der *Caliciviridae* gehörendes Virus, das sowohl sporadische Fälle als auch große Ausbrüche von akuter Gastroenteritis verursacht

Anmerkung 1 zum Begriff: Aus genetischer Sicht kann das Norovirus in sieben einzelne Genogruppen unterteilt werden. Drei dieser Genogruppen, GI, GII und GIV, sind Auslöser gastrointestinaler Erkrankungen beim Menschen. GI und GII sind für die überwiegende Mehrheit der klinischen Fälle verantwortlich.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Übertragung erfolgt fäkal-oral durch Mensch-zu-Mensch-Kontakt, über den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln sowie durch den Kontakt mit kontaminiertem Wasser, kontaminierten Lebensmitteloberflächen oder kontaminierten Virusträgern. GI- und GII-Noroviren werden von der Europäischen Union als biologische Agenzien der Gruppe 2 und von den nationalen Gesundheitsinstituten der Vereinigten Staaten (en: United States National Institutes of Health) als human-ätiologische Agenzien der Risikogruppe 2 eingestuft.

3.7

quantitative Bestimmung von HAV

Quantifizierung von HAV

Abschätzung der Anzahl der Kopien von HAV-RNA in einer zuvor festgelegten Masse, einem zuvor festgelegten Volumen eines Lebensmittels oder einem zuvor festgelegten Flächeninhalt einer Lebensmitteloberfläche

3.8**quantitative Bestimmung des Norovirus**

Quantifizierung des Norovirus

Abschätzung der Anzahl der Kopien von Norovirus-RNA in einer zuvor festgelegten Masse, einem zuvor festgelegten Volumen eines Lebensmittels oder einem zuvor festgelegten Flächeninhalt einer Lebensmitteloberfläche

3.9**Prozesskontrollvirus**

zum frühestmöglichen Zeitpunkt vor der Virusextraktion zur Untersuchungsprobe hinzugefügtes Virus, um die Extraktionseffizienz zu überprüfen

3.10**Prozesskontrollvirus-RNA**

aus dem Prozesskontrollvirus extrahierte RNA für die Generierung einer Standardkurve zur Abschätzung der Extraktionseffizienz

3.11**negative RNA-Extraktionskontrolle**

Kontrolle ohne Ziel-RNA, mit der sämtliche Schritte der RNA-Extraktion durchgeführt werden, um eventuelle Kreuzkontaminationen zu erfassen

3.12**negative Prozesskontrolle**

Probe der Lebensmittelmatrix ohne pathogenen Zielkeim oder matrixfreie Probe ohne pathogenen Zielkeim, die sämtliche Stufen des analytischen Prozesses durchläuft

3.13**Hydrolysesonde**

Fluoreszenzsonde, die mit einem fluoreszierenden Reportermolekül und einem Quencher-Molekül gekoppelt ist, die während des Amplifikationsprozesses, bedingt durch die 5'–3'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms, sterisch voneinander getrennt werden

3.14**negative Real-time-RT-PCR-Kontrolle**

Aliquot an hochreinem Wasser, das in einer Real-time-RT-PCR-Reaktion zur Überprüfung der Real-time-RT-PCR-Reagenzien auf eventuelle Kontamination verwendet wird

3.15**externe Kontroll-RNA****EC-RNA**

Referenz-RNA, die zur Bestimmung der Inhibition der Amplifikation bei dem entsprechenden Real-time-RT-PCR-Reaktionsansatz genutzt werden kann, indem sie in einer gesonderten Reaktion in einer definierten Menge einem Aliquot der Proben-RNA hinzugefügt wird

BEISPIEL Durch *In-vitro*-Transkription von einem Plasmid, das eine Kopie des Zielgens enthält, synthetisierte RNA.

3.16 **C_q -Wert**

quantitativer Zyklus; der Zyklus, bei dem das Zielmolekül einer gegebenen Real-time-RT-PCR quantitativ bestimmt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Das entspricht dem Wert, bei dem die Fluoreszenz der Reaktion einen Schwellenwert überschreitet.

3.17

Nachweisgrenze

LOD

(en: limit of detection)

niedrigste Konzentration des Zielmoleküls in einer Untersuchungsprobe, die unter den im Verfahren festgelegten Versuchsbedingungen reproduzierbar nachgewiesen werden kann (95 %-Konfidenzintervall)

Anmerkung 1 zum Begriff: Die LOD ist abhängig von der Einwaage und der Qualität des RNA-Templates.

3.18

Bestimmungsgrenze

LOQ

(en: limit of quantification)

niedrigste Konzentration des Zielmoleküls in einer Untersuchungsprobe, die unter den im Verfahren festgelegten Versuchsbedingungen mit ausreichender Präzision und Genauigkeit quantitativ bestimmt werden kann

Anmerkung 1 zum Begriff: Die LOQ ist abhängig von der Einwaage und der Qualität des RNA-Templates.

4 Kurzbeschreibung

4.1 Virusgewinnung

Die in diesem Dokument erfassten Lebensmittel und Lebensmitteloberflächen stellen z. T. hochkomplexe Matrices dar und die Zielviren können in geringer Konzentration vorliegen. Deshalb ist es notwendig, das Verfahren der Virusgewinnung und/oder der Virusanreicherung an die jeweilige Untersuchungsmatrix anzupassen, um ein Substrat für die darauffolgenden allgemeinen Prozessschritte zu erhalten. Die Wahl des Verfahrens ist abhängig von der jeweiligen Untersuchungsmatrix.

4.2 RNA-Extraktion

Es ist notwendig, für die RNA-Extraktion ein Verfahren auszuwählen, das zu RNA-Extrakten von geeigneter Reinheit führt, um die Auswirkung vorhandener RT-PCR-Inhibitoren zu reduzieren. In diesem Dokument wird das chaotrope Salz Guanidinthiocyanat verwendet, um das Viruskapsid aufzubrechen. Die RNA wird anschließend an Silica (Siliciumdioxid) adsorbiert, um die Aufreinigung durch mehrere Waschschrte zu unterstützen. Die aufgereinigte virale RNA wird vor der Real-time-RT-PCR von der Silica-Matrix in eine Pufferlösung eluiert.

4.3 Real-time-RT-PCR (Real-time-Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion)

In diesem Dokument wird eine One-Step-Real-time-RT-PCR unter Verwendung von Hydrolysesonden angewendet. Bei der One-Step-Real-time-RT-PCR werden reverse Transkription und PCR-Amplifikation nacheinander im selben Reaktionsgefäß durchgeführt.

Bei der Real-time-RT-PCR unter Verwendung einer Hydrolysesonde wird eine kurze DNA-Sonde verwendet, an deren gegenüberliegenden Enden ein Fluoreszenzmarker und ein Fluoreszenzquencher gebunden sind. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ermöglicht, dass die Sonde hydrolysiert und das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes ansteigt. Die Fluoreszenz kann während des Zyklus auf jeder Stufe gemessen werden. Der erste Zyklus in der Real-time-RT-PCR, bei dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz überschreitet, entspricht der Ausgangsmenge an RNA; die Analyse der Fluoreszenzkurven ermöglicht somit die Konzentrationsbestimmung der Zielsequenz in der Probe.

Aufgrund der oft in Lebensmitteln oder auf Lebensmitteloberflächen vorliegenden geringen Mengen an Template-Viren und der Diversität der einzelnen Zielvirusstämme ist es von Bedeutung, sowohl geeignete Reagenzien für die One-Step-Real-time-RT-PCR als auch geeignete PCR-Primer und Hydrolysesonden auszuwählen. Leitlinien für deren Auswahl sind in 5.2.18 und 5.2.19 angeführt. Erläuternde Einzelheiten zu den Reagenzien, Primern und Sonden (die bei der Erarbeitung dieses Dokuments verwendet wurden) sind in den Anhängen C und D aufgeführt.

4.4 Kontrollmaterialien

4.4.1 Prozesskontrollvirus

Verluste an Zielviren können während verschiedener Stufen bei der Virusgewinnung aus der Probe und der RNA-Extraktion auftreten. Um diese Verluste mit zu erfassen, werden die Proben zum frühestmöglichen Zeitpunkt vor der Virusextraktion mit einer festgelegten Menge eines Prozesskontrollvirus versetzt. Bei jeder Probe muss die Wiederfindungsrate des Prozesskontrollvirus bestimmt werden.

Das zur Verwendung als Prozesskontrolle ausgewählte Virus muss ein kultivierbares, nicht umhülltes, einzelsträngiges RNA-Virus in Plusstrangorientierung sein sowie eine ähnliche Größe wie die Zielviren aufweisen, um ein morphologisch und physikalisch-chemisch vergleichbares Modell darzustellen. Zusätzlich muss das Prozesskontrollvirus eine ähnliche Umweltstabilität wie die Zielviren aufweisen. Das Virus muss sich genetisch hinreichend von den Zielviren unterscheiden, damit bei der Real-time-RT-PCR zwischen den Ansätzen für den Zielvirus und den Prozesskontrollvirus keine Kreuzreaktionen auftreten, und es darf nicht naturgemäß in den zu untersuchenden Lebensmitteln oder auf den zu untersuchenden Lebensmitteloberflächen vorkommen.

Ein Beispiel zur Herstellung eines Prozesskontrollvirus (das bei der Erarbeitung dieses Dokuments verwendet wurde) ist in Anhang E angeführt.

4.4.2 Doppelsträngige DNA-Kontrolle (dsDNA-Kontrolle)

Zur quantitativen Bestimmung eines Zielvirus müssen die Ergebnisse in Bezug zu einem Standard bekannter Konzentration gesetzt werden. Zur Erstellung einer Standardkurve in Template-Kopien je Mikroliter muss eine Verdünnungsreihe mit linearer dsDNA, die die zu bestimmende Zielsequenz (5.3.11) enthält und mittels geeigneter Methode, z. B. spektrophotometrisch, fluorimetrisch, digitale PCR usw., quantifiziert wurde, verwendet werden. Die Standardkurve ermöglicht die quantitative Bestimmung der Proben-RNA in nachweisbaren Virusgenomkopien je Mikroliter.

4.4.3 EC-RNA-Kontrolle

Viele Lebensmittelmatriices enthalten Substanzen, die sich hemmend auf die RT-PCR auswirken. Außerdem besteht die Möglichkeit der Verschleppung von inhibierenden Substanzen aus einem vorhergehenden Aufarbeitungsschritt. Um eine Inhibition der RT-PCR in den einzelnen Proben nachzuweisen, wird eine externe Kontroll-RNA (EC-RNA) (RNA-Spezies, die die zu bestimmende Zielsequenz enthält (5.3.12)) einem Aliquot Proben-RNA hinzugefügt und mittels Real-time-RT-PCR analysiert. Der Vergleich der Ergebnisse dieses Ansatzes mit dem Ergebnis des Reaktionsansatzes, bei dem nur die EC-RNA, jedoch keine Proben-RNA zugegeben wurde, ermöglicht die Bestimmung des Grades der Inhibition der RT-PCR in jeder einzelnen Untersuchungsprobe.

Die Verwendung eines alternativen Verfahrens für die Bewertung der RT-PCR-Inhibition ist zulässig, wenn nachweislich ein gleichwertiges Ergebnis wie bei dem hier beschriebenen Verfahren mit EC-RNA-Kontrolle erzielt wird.

4.5 Untersuchungsergebnisse

Das bei diesem Verfahren erhaltene Ergebnis wird in nachweisbaren Virusgenomkopien je Milliliter, Gramm oder Quadratzentimeter angegeben. Bei Proben, bei denen kein Virus nachgewiesen wurde, ist als Ergebnis „nicht nachgewiesen; <z nachweisbare Virusgenomkopien je Milliliter, Gramm oder Quadratzentimeter“ anzugeben, wobei z die Nachweisgrenze (LOD) für die Probe ist.

5 Reagenzien

5.1 Allgemeines

Sofern nicht anders angegeben, sind nur Reagenzien von anerkannter Analysereinheit zu verwenden.

Die übliche Laborpraxis wird befolgt, wie in ISO 7218 festgelegt.

5.2 Reagenzien, die im Lieferzustand verwendet werden

5.2.1 Wasser für die Molekularbiologie.

5.2.2 Polyethylenglykol (PEG), mit einer mittleren relativen Molekülmasse von 8 000.

5.2.3 Natriumchlorid (NaCl).

5.2.4 Kaliumchlorid (KCl).

5.2.5 Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4).

5.2.6 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4).

5.2.7 TRIS (Trishydroxymethylaminomethan) als Base.

5.2.8 Glycin.

5.2.9 Rindfleischextrakt in Pulverform.

5.2.10 Proteinase K.

5.2.11 Pektinase von *Aspergillus niger* oder *A. aculeatus*.

5.2.12 Chloroform.

5.2.13 n-Butanol.

5.2.14 Natriumhydroxid (NaOH) ($\geq 10 \text{ mol/l}$).

5.2.15 Salzsäure (HCl) ($\geq 5 \text{ mol/l}$).

5.2.16 Ethylendiamintetraacetat (EDTA).

5.2.17 Silica, Lysis-, Wasch- und Elutionspuffer zur Extraktion der viralen RNA. Mit den Reagenzien müssen 500 µl Probenextrakt verarbeitet werden können, wobei die Lysis mit einer chaotropen Pufferlösung erfolgt, die Guanidinthiocyanat enthält [3], und Silica als Matrix zur Bindung der RNA verwendet wird. Nach der Reinigung der Silica-gebundenen RNA mit Waschpuffer(n) muss die RNA in 100 µl Elutionspuffer eluiert werden.

Der RNA-Extrakt muss hinsichtlich Qualität und Konzentration für den vorgesehenen Zweck geeignet sein. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zu den Reagenzien für die RNA-Extraktion (die bei der Erarbeitung des in diesem Dokument beschriebenen Verfahrens verwendet wurden) siehe Anhang F.

5.2.18 Reagenzien für die One-Step-Real-time-RT-PCR. Die Reagenzien müssen gewährleisten, dass 5 µl RNA-Extrakt in einem Gesamtvolumen von 25 µl analysiert werden können. Sie müssen für die One-Step-Real-time-RT-PCR unter Verwendung von Hydrolysesonden (die verwendete DNA-Polymerase muss eine 5' zu 3'-Exonuklease-Aktivität aufweisen) geeignet und hinreichend sensitiv für den Nachweis von Virus-RNA sein, wie sie üblicherweise in viruskontaminierten Lebensmitteln und auf viruskontaminierten Lebensmitteloberflächen zu erwarten ist. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zu den Reagenzien für die One-Step-Real-time-RT-PCR (die bei der Erarbeitung dieses Dokuments verwendet wurden) siehe Anhang C.

5.2.19 Primer und Hydrolysesonden für den Nachweis von HAV und Norovirus GI und GII. Die Sequenzen von Primern und Hydrolysesonden müssen in einer angesehenen wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht und ihre Verwendung an einem breiten Spektrum an Virusstämmen getestet worden sein. Die Primer für den Nachweis von HAV müssen auf den 5'-nicht-codierenden Bereich des Genoms ausgerichtet sein. Die Primer für den Nachweis von Norovirus GI und GII müssen auf den Verbindungsbereich von ORF1/ORF2 des Genoms ausgerichtet sein. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zu den Primern und Hydrolysesonden (die bei der Erarbeitung dieses Dokuments verwendet wurden) siehe Anhang D.

5.2.20 Primer und Hydrolysesonden für den Nachweis des Prozesskontrollvirus. Die Sequenzen von Primern und Hydrolysesonden müssen in einer angesehenen wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht und mit dem als Prozesskontrolle verwendeten Virusstamm getestet worden sein. Sie dürfen nachweislich keine Kreuzreaktivität mit dem Zielvirus aufweisen.

5.3 Herzustellende Reagenzien

Aufgrund der großen Anzahl von Reagenzien, die einzeln hergestellt werden müssen, sind die Einzelheiten zu Zusammensetzung und Herstellung in Anhang B angeführt.

5.3.1 5-fach konzentrierte PEG/NaCl-Lösung (500 g/l PEG 8 000, 1,5 mol/l NaCl); siehe B.1.

5.3.2 Chloroform/Butanol-Gemisch (Volumenanteile 1 : 1); siehe B.2.

5.3.3 Proteinase-K-Lösung (3 000 U/l); siehe B.3.

5.3.4 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS); siehe B.4.

5.3.5 TRIS/Glycin/Rindfleischextrakt-Puffer (TGBE-Puffer); siehe B.5.

5.3.6 TRIS-Lösung (1 mol/l); siehe B.6.

5.3.7 EDTA-Lösung (0,5 mol/l); siehe B.7.

5.3.8 TRIS-EDTA-Puffer (TE-Puffer) (10 mmol/l TRIS, 1 mmol/l EDTA); siehe B.8.

5.3.9 Virusmaterial für die Prozesskontrolle. Die Stammlösung des Prozesskontrollvirus ist mindestens mit einem Faktor von 10 in einer geeigneten Pufferlösung, z. B. PBS (5.3.4), zu verdünnen. Diese Verdünnung muss einen inhibitionsfreien Nachweis des Genoms des Prozesskontrollvirus in der Real-time-RT-PCR ermöglichen, aber noch hinreichend konzentriert sein, um einen reproduzierbaren Nachweis der größten Verdünnung zu ermöglichen, die für die Standardkurve der Prozesskontrollvirus-RNA verwendet wird (8.4.2.2). Das verdünnte Virusmaterial für die Prozesskontrolle wird in Aliquote zur einmaligen Verwendung aufgeteilt und bei -15 °C oder kälter aufbewahrt. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zur Herstellung eines Prozesskontrollvirus (wie bei der Erarbeitung des in diesem Dokument beschriebenen Verfahrens verwendet) siehe Anhang E.

5.3.10 Real-time-RT-PCR-Mastermixe für das Zielvirus und das Prozesskontrollvirus. Die Reagenzien müssen in den vom Hersteller festgelegten Verhältnissen zugegeben werden (5.2.18), um je Reaktion $20\text{ }\mu\text{l}$ Mastermix für ein Gesamtreaktionsvolumen von $25\text{ }\mu\text{l}$ zu erhalten. Die optimalen Konzentrationen an Primern und Sonde sind in Anlehnung an die Empfehlungen der Reagenzienhersteller zu bestimmen. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zu den Real-time-RT-PCR-Mastermixen (die bei der Erarbeitung dieses Dokuments verwendet wurden) siehe Anhang C.

5.3.11 dsDNA-Kontrollmaterial. Es sind aufgereinigte, lineare DNA-Moleküle, die die Zielsequenz für das jeweilige Zielvirus enthalten, zu verwenden. Die Sequenz der DNA-Moleküle ist vor der ersten Verwendung zu überprüfen. Die Präparationen dürfen zu keiner Inhibition der RT-PCR führen. Die Konzentration der jeweiligen dsDNA-Stammlösung ist in Template-Kopien je Mikroliter zu bestimmen. Anschließend ist die Stammlösung in einem geeigneten Puffer, z. B. TE-Puffer, (5.3.8), auf eine Konzentration von 1×10^4 bis 1×10^5 Template-Kopien je Mikroliter einzustellen. Da EDTA zu einer Inhibition in der RT-PCR führen kann, dürfen die zur Verdünnung der dsDNA verwendeten Puffer keine EDTA-Konzentrationen von mehr als 1 mmol/l enthalten. Die verdünnte dsDNA-Präparation (dsDNA-Kontrollmaterial) wird in Aliquote zur einmaligen Verwendung aufgeteilt und bei $(5 \pm 3)\text{ °C}$ für bis zu 24 h, bei -15 °C oder kälter für bis zu sechs Monate oder bei -70 °C oder kälter für längere Zeiträume aufbewahrt. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zur Herstellung der dsDNA (die bei der Erarbeitung dieses Dokuments verwendet wurde) siehe Anhang G.

5.3.12 RNA-Kontrollmaterial für die externe Kontrolle (EC). Aufgereinigte Einzelstrang-RNA (ssRNA), welche die Zielsequenz für das jeweilige Zielvirus enthält, ist zu verwenden. Die Kontamination mit Ziel-DNA darf höchstens $0,1\%$ betragen und darf in der RT-PCR zu keiner Inhibition führen. Die Konzentration der jeweiligen EC-RNA-Stammlösung ist in Kopien je Mikroliter zu bestimmen. Anschließend ist die Stammlösung in einem geeigneten Puffer, z. B. TE-Puffer (5.3.8), auf eine Konzentration von 1×10^2 bis 1×10^5 Template-Kopien je Mikroliter einzustellen. Die verwendete Konzentration muss für die zu untersuchenden Probenarten geeignet sein und sicherstellen, dass die Berechnungen zur RT-PCR-Inhibition nicht durch das Vorhandensein von endogener Ziel-RNA in den Proben beeinträchtigt werden. Da EDTA zu einer Inhibition in der RT-PCR führen kann, dürfen die zur Verdünnung der EC-RNA verwendeten Puffer keine EDTA-Konzentrationen von mehr als 1 mmol/l enthalten. Die verdünnte EC-RNA-Präparation (EC-RNA-Kontrollmaterial) wird in Aliquote zur einmaligen Verwendung aufgeteilt und bei $(5 \pm 3)\text{ °C}$ für bis zu 24 h, bei -15 °C oder kälter für bis zu sechs Monate oder bei -70 °C oder kälter für längere Zeiträume aufbewahrt. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zur Herstellung von EC-RNA (die bei der Erarbeitung dieses Dokuments verwendet wurde) siehe Anhang H.

6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

Zusätzlich zur üblichen Grundausstattung für mikrobiologische Laboratorien (ISO 7218) wird Folgendes benötigt.

6.1 Mikropipetten und Pipettenspitzen verschiedener Größen, z. B. $1\,000\text{ }\mu\text{l}$, $200\text{ }\mu\text{l}$, $20\text{ }\mu\text{l}$, $10\text{ }\mu\text{l}$. Es sollten aerosolgeschützte Pipettenspitzen verwendet werden, es sei denn, es werden Pipettenspitzen ohne Filter benötigt, z. B. für die Absaugung (wie in 6.7 und F.3).

6.2 Pipettierhilfe und Pipetten verschiedener Größen, z. B. 25 ml , 10 ml , 5 ml .

6.3 Vortex-Mischer.

6.4 Schüttelgerät das bei Schüttel- oder Wippbewegungen von etwa 50 min^{-1} betrieben werden kann.

6.5 Schüttelinkubator der bei $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ und Schüttel- oder Wippbewegungen von etwa 320 min^{-1} betrieben werden kann, oder ein gleichwertiges Gerät.

6.6 Schüttel- oder Wipptisch(e) oder ein gleichwertiges Gerät zur Anwendung bei Raumtemperatur und $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ und bei Schüttel- oder Wippbewegungen von etwa 60 min^{-1} .

6.7 Ansaugvorrichtung oder ein gleichwertiges Gerät zum Entfernen eines Überstandes.

6.8 Wasserbad das bei $(60 \pm 2) ^\circ\text{C}$ betrieben werden kann, oder ein gleichwertiges Gerät.

6.9 Zentrifuge(n) und Rotor(en), die mit den folgenden Laufgeschwindigkeiten, Lauftemperaturen und Rotorkapazitäten betrieben werden können:

- a) $10\,000 \text{ g}$ bei $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ für die Verwendung von Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von mindestens 35 ml Volumen;
- b) $10\,000 \text{ g}$ bei $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ für die Verwendung von chloroformbeständigen Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 2 ml Volumen;
- c) $4\,000 \text{ g}$ bei Raumtemperatur für Zentrifugal-Filter-Konzentratoren (6.16).

6.10 Mikrozentrifuge.

6.11 Zentrifugen- und Mikrozentrifugenröhrchen und -flaschen verschiedener Größen, $1,5 \text{ ml}$, 5 ml , 15 ml , 50 ml usw. Es werden chloroformbeständige Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 2 ml benötigt.

6.12 pH-Meter (oder pH-Teststreifen mit Skalierung von $0,5 \text{ pH-Einheiten}$ oder niedriger).

6.13 Sterile Wattetupfer.

6.14 Beutel mit Gewebefilter (400 ml).

6.15 Positiv geladene Membranfilter mit einer Porengröße von $0,45 \mu\text{m}$ (Durchmesser 47 mm).

6.16 Zentrifugal-Filter-Konzentratoren mit einem Fassungsvermögen von 15 ml und einem Größenausschluss bei einer relativen Molekülmasse von 100 kDa .

6.17 Vakuumpumpe oder gleichwertige Überdruckvorrichtung zum Filtrieren und Filtrationsvorrichtung zur Verwendung von Membranen mit einem Durchmesser von 47 mm .

6.18 Steriles Austernmesser oder gleichwertiges Werkzeug zum Öffnen von zweischaligen Weichtieren (BMS, en: bivalve molluscan shellfish).

6.19 Gummiblock oder gleichwertige Vorrichtung zum Festhalten der zweischaligen Weichtiere beim Öffnen.

6.20 Schere und Pinzette oder gleichwertige Werkzeuge zum Zerlegen der zweischaligen Weichtiere.

6.21 Sterile Petrischalen.