

DIN EN ISO 15216-1



ICS 07.100.30

Ersatz für
DIN EN ISO 15216-1:2017-07

**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 + Amd 1:2021);
Deutsche Fassung EN ISO 15216-1:2017 + A1:2021**

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 + Amd 1:2021);
German version EN ISO 15216-1:2017 + A1:2021

Microbiologie de 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 + Amd 1:2021);
Version allemande EN ISO 15216-1:2017 + A1:2021

Gesamtumfang 61 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 15216-1:2017 + A1:2021) 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 Arbeitskreis NA 057-01-06-20 AK „Viren“ des Arbeitsausschusses NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Dieses Dokument enthält die Änderung 1, angenommen von CEN am 2021-01-15.

Der Beginn und das Ende von neuem oder geändertem Text werden durch die Markierungen **A1** **A1** angezeigt.

Für die in diesem Dokument zitierten 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

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 15216-1:2017-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) in 5.2.16 den Text in „Ethyldiamintetraacetat (EDTA) Dinatriumsalz-Dihydrat“ geändert;
- b) in 8.2.5 ersten Absatz überarbeitet;
- c) in B.2.2 den Text überarbeitet;
- d) in B.7.1 „Ethyldiamintetraacetat (EDTA)“ in „Ethyldiamintetraacetat (EDTA) Dinatriumsalz-Dihydrat“ geändert;
- e) in B.7.2 „EDTA“ in „EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat“ geändert;
- f) in Abschnitt E.1 ersten Absatz und Fußnote 2 überarbeitet;
- g) in F.1.1 Fußnote 3 überarbeitet;
- h) F.2.1 und F.2.2 durch neuen Unterabschnitt ersetzt;
- i) F.2.3 neu benummert (jetzt F.2.2);
- j) F.2.4 gestrichen;

- k) Abschnitt F.3 überarbeitet;
- l) Dokument redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN CEN ISO/TS 15216-1 (DIN SPEC 10051-1): 2013-08
DIN EN ISO 15216-1: 2017-07

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 die Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

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 + Amd 1:2021)**

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 + Amd 1:2021)

Microbiologie de 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 + Amd 1:2021)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 23. Februar 2017 angenommen. Die Änderung A1 modifiziert die Europäische Norm EN ISO 15216-1:2017. Sie wurde vom CEN am 15. Januar 2021 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 CEN-CENELEC-Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, 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: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
[A1] Europäisches Vorwort der Änderung 1 [A1]	5
Vorwort	6
[A1] Vorwort der Änderung 1 [A1]	7
Einleitung	8
1 Anwendungsbereich	9
2 Normative Verweisungen	9
3 Begriffe	9
4 Kurzbeschreibung	12
4.1 Virusextraktion	12
4.2 RNA-Extraktion	12
4.3 Real-time-RT-PCR (Real-time-Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)	12
4.4 Kontrollmaterialien	13
4.4.1 Prozesskontrollvirus	13
4.4.2 Doppelsträngige DNA-Kontrolle (dsDNA-Kontrolle)	13
4.4.3 EC-RNA-Kontrolle	13
4.5 Untersuchungsergebnisse	13
5 Reagenzien	14
5.1 Allgemeines	14
5.2 Reagenzien, die im Lieferzustand verwendet werden	14
5.3 Herstellende Reagenzien	15
6 Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
7 Probenahme	18
8 Durchführung	18
8.1 Allgemeine Anforderungen an Labore	18
8.2 Virusgewinnung	18
8.2.1 Virusmaterial für die Prozesskontrolle	18
8.2.2 Negative Prozesskontrolle	18
8.2.3 Lebensmitteloberflächen	18
8.2.4 Weiches Obst, Blatt-, Stängel- und Zwiebelgemüse	19
8.2.5 In Flaschen abgefülltes Trinkwasser	20
8.2.6 Zweischalige Weichtiere (BMS, en: bivalve molluscan shellfish)	20
8.3 RNA-Extraktion	21
8.4 Real-time-RT-PCR	21
8.4.1 Allgemeine Anforderungen	21
8.4.2 Analyse mit Real-time-RT-PCR	22
9 Auswertung der Ergebnisse	24
9.1 Allgemeines	24
9.2 Erstellen von Standardkurven	24
9.3 Berechnung der RT-PCR-Inhibition	25
9.4 Berechnung der Extraktionseffizienz	26
9.5 Quantitative Bestimmung der Proben	27

10	Angabe der Ergebnisse.....	27
11	Präzision.....	28
11.1	Ringversuch.....	28
11.2	Wiederholpräzision.....	28
11.3	Vergleichgrenze	29
12	Untersuchungsbericht.....	29
	Anhang A (normativ) Schematische Darstellung des Verfahrens	30
	Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung von Reagenzien und Pufferlösungen	31
	Anhang C (informativ) Real-time-RT-PCR-Mastermixe und Parameter für die Durchführung der PCR.....	34
	Anhang D (informativ) Real-time-RT-PCR-Primer und -Hydrolysesonden für den Nachweis von HAV, Norovirus GI und GII sowie Mengovirus (Prozesskontrolle).....	35
	Anhang E (informativ) Vermehrung des Mengovirus-Stammes MC₀ 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.

■ A1 ■ Europäisches Vorwort der Änderung 1 ■ A1 ■

■ A1 ■ Dieses Dokument (EN ISO 15216-1:2017/A1:2021) 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.

Diese Änderung zur Europäischen Norm EN ISO 15216-1:2017 muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Oktober 2021, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2021 zurückgezogen werden.

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

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, 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/Amd 1:2021 wurde von CEN als EN ISO 15216-1:2017/A1:2021 ohne irgendeine Abänderung genehmigt. ■ A1 ■

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.

■ A1 Vorwort der Änderung 1 A1

■ A1 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-Direktiven, 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-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 erhaltenen Patenterklärungen (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*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 463, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 15216 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. ■ A1

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 Lebensmittelmatrices. Der Nachweis beruht daher auf molekularbiologischen Verfahren unter Anwendung der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR). Da viele Lebensmittelmatrices 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 die Adsorption und Elution der Viren unter Verwendung positiv geladener Membranen und anschließender Anreicherung mittels Ultrafiltration. Bei zweischaligen Weichtieren (Muscheln; BMS, en: bivalve molluscan shellfish) werden die Viren aus dem Gewebe der Verdauungsdrüsen durch Behandlung mit einer Proteinase-K-Lösung extrahiert. Bei allen Matrices, die nicht in diesem Dokument aufgeführt sind, ist es notwendig, dieses Verfahren zu validieren. Für sämtliche Matrices wird ein einheitliches RNA-Extraktionsverfahren verwendet, das auf dem Aufschluss des Viruskapsids mittels chaotroper Reagenzien und anschließender Adsorption der RNA an Silica-Partikel 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 den Bedarf an zusätzlichen Schritten 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 Untersuchungsablaufs 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 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 Lebensmittel aus mehreren Bestandteilen) 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: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar 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 sowie durch den Kontakt mit kontaminiertem Wasser, kontaminierten Lebensmitteloberflächen oder 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 von Daten für eine Standardkurve zur Abschätzung der Extraktionseffizienz

3.11

negative RNA-Extraktionskontrolle

Kontrolle ohne Ziel-RNA, mit der sämtliche Schritte der RNA-Extraktion und des Nachweisprozesses 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 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 Prüfmenge 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 Prüfmenge und der Qualität des RNA-Templates.

4 Kurzbeschreibung

4.1 Virusextraktion

Die in diesem Dokument erfassten Lebensmittel und Lebensmitteloberflächen stellen häufig hochkomplexe Matrices dar und die Zielviren können in geringen Konzentrationen vorliegen. Deshalb ist es notwendig, das Verfahren der Virusextraktion 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 Matrix.

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 Agens 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 in eine Pufferlösung eluiert.

4.3 Real-time-RT-PCR (Real-time-Reverse-Transkriptase-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 von Hydrolysesonden wird eine kurze DNA-Sonde verwendet, an deren gegenüberliegenden Enden ein Fluoreszenzmarker und ein Fluoreszenzquencher gebunden sind. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes stellt sicher, 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 die Amplifikation für jegliche Reaktion bestimmt werden kann, ist proportional zu der Menge des Templates; 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 Viren-Template und der Diversität der Zielviren ist es von Bedeutung, sowohl geeignete Reagenzien für die One-Step-Real-time-RT-PCR als auch geeignete PCR-Primer und Hydrolysesonden für die Zielviren 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 Anhang C und Anhang D aufgeführt.

4.4 Kontrollmaterialien

4.4.1 Prozesskontrollvirus

Verluste an Zielviren können während verschiedener Stufen bei der Virusextraktion 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 das Zielvirus und das 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., quantitativ bestimmt wurde, verwendet werden. Der Bezug auf die Standardkurve ermöglicht die quantitative Bestimmung der Proben-RNA in nachweisbaren Virusgenomkopien je Mikroliter.

4.4.3 EC-RNA-Kontrolle

Viele Lebensmittelmatrizen 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 von alternativen Verfahren 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, je Gramm oder je Quadratzentimeter angegeben. Bei Proben, bei denen kein Virus nachgewiesen wurde, wird als Ergebnis „nicht nachgewiesen; < z nachweisbare Virusgenomkopien je Milliliter, je Gramm oder je Quadratzentimeter“ angegeben, wobei z die Nachweisgrenze (LOD) für die Probe ist.

5 Reagenzien

5.1 Allgemeines

Sofern nicht anders festgelegt, werden nur Reagenzien von anerkannter Analysereinheit verwendet.

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) (≥ 10 mol/l).

5.2.15 Salzsäure (HCl) (≥ 5 mol/l).

5.2.16 Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Dinatriumsalz-Dihydrat.

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 wissenschaftlichen Fachzeitschrift (en: peer-reviewed journal) veröffentlicht und ihre Verwendung an einem breiten Spektrum an Zielvirusstämmen verifiziert 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 wissenschaftlichen Fachzeitschrift (en: peer-reviewed journal) veröffentlicht und mit dem als Prozesskontrolle verwendeten Virusstamm verifiziert 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 muss mindestens mit einem Faktor von 10 in einem geeigneten Puffer, z. B. PBS (5.3.4), verdünnt werden. 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 des 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 µl Mastermix für ein Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl zu erhalten. Die optimalen Konzentrationen an Primern und Sonde müssen in Anlehnung an die Empfehlungen der Reagenzienhersteller bestimmt werden. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zu den Real-time-RT-PCR-Mastermixen (die bei der Erarbeitung dieses Dokuments verwendet wurden) siehe Anhang C.