DEUTSCHE NORM **Entwurf** September 2015

DIN EN ISO 15216-1

DIN

ICS 07.100.30

Entwurf

Einsprüche bis 2015-10-14
Vorgesehen als 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 in Lebensmitteln mittels Real-time-RT-PCR – Teil 1: Verfahren zur Quantifizierung (ISO/DIS 15216-1:2015); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 15216-1:2015

Microbiology of the food chain –
Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR –
Part 1: Method for quantification (ISO/DIS 15216-1:2015);
German and English version prEN ISO 15216-1:2015

Microbiologie dans la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel –
Partie 1: Méthode de quantification (ISO/DIS 15216-1:2015);
Version allemande et anglaise prEN ISO 15216-1:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-08-14 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de 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/stellungnahme 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 (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

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

Gesamtumfang 104 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Nationales Vorwort

Der hiermit der Öffentlichkeit zur Stellungnahme vorgelegte Norm-Entwurf wurde von der Arbeitsgruppe 6 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ (Sekretariat: Frankreich) des Technischen Komitees CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: Deutschland) erarbeitet. Auf Grund der Zusammenarbeit mit dem ISO/TC 34/SC 9 „Mikrobiology“ (Sekretariat: Frankreich) im Rahmen der Wiener Vereinbarung ist dieser Norm-Entwurf auch als Internationaler Norm-Entwurf erschienen.

Die Mitarbeit des DIN in der Arbeitsgruppe 6 des CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ und im SC 9 des ISO/TC 34 „Food products“ wird über den Arbeitsausschuss NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ des DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen. Zuständig für diesen Norm-Entwurf ist der Arbeitskreis NA 057-01-06-20 AK „Viren“.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung prEN ISO 15216-1 beigefügt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die im Abschnitt 2 zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 22174 siehe DIN EN ISO 22174

Änderungen:

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

a) die Verwendung von linearen dsDNS-Molekülen für die Quantifizierung wird vorgeschrieben;

b) die Verwendung eines geeigneten Puffers für die Verdünnung von Kontrollmaterialien wird vorgeschrieben;

c) Änderung des Verfahrens zur Erzeugung von Prozesskontrollvirus-RNA für die Standardkurve;

d) Hinzufügung von Haltepunkten in den Extraktionsverfahren;

e) Änderung an der Terminologie von Amplifikationseffizienz zu Inhibition der RT-PCR;

f) Hinzufügung von zusätzlichen Real-Time-RT-PCR-Reaktionen für negative Kontrollen;

g) Einfügung von Präzisionsdaten und Ergebnisse einer laborübergreifenden Studie.

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

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

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

— *Entwurf* —

CEN/TC 275

Datum: 2015-08

prEN ISO 15216-1:2015

CEN/TC 275

Sekretariat: DIN

Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zur Bestimmung von Hepatitis A-Virus und Norovirus in Lebensmitteln mittels Real-time-RT-PCR — Teil 1: Verfahren zur Quantifizierung (ISO/DIS 15216-1:2015) (ISO/DIS 15216-1:2015)

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel — Partie 1 : Méthode de quantification (ISO/DIS 15216-1:2015) (ISO/DIS 15216-1:2015)

Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR — Part 1: Method for quantification (ISO/DIS 15216-1:2015) (ISO/DIS 15216-1:2015)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.5a

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Inhalt

Seite

Vorwort **3**

Einleitung **4**

1 Anwendungsbereich **5**

2 Normative Verweisungen **5**

3 Begriffe **5**

4 Kurzbeschreibung **7**

5 Reagenzien **8**

6 Geräte und Materialien **11**

7 Probenahme **12**

8 Durchführung **12**

9 Auswertung der Ergebnisse **18**

10 Angabe der Ergebnisse **20**

11 Präzision des Verfahrens **20**

12 Untersuchungsbericht **21**

Anhang A (normativ) **Schematische Darstellung des Verfahrens** **22**

Anhang B (informativ) **Real-time RT-PCR-Mastermixe und Parameter für die Durchführung der PCR** **23**

Anhang C (informativ) **Real-time RT-PCR-Primer und -Hydrolysesonden für den Nachweis von HAV, Norovirus GI und GII sowie Mengo-Virus (Prozesskontrolle)** **24**

Anhang D (informativ) **Vermehrung des Mengovirus-Stammes MC_0 zur Verwendung als Prozesskontrolle** **27**

Anhang E (informativ) **RNS-Extraktion unter Anwendung des BioMerieux NucliSens®-Systems** **28**

Anhang F (normativ) **Zusammensetzung und Herstellung von Reagenzien und Pufferlösungen** **30**

Anhang G (informativ) **Herstellung von doppelsträngiger Kontroll-DNS (dsDNS)** **33**

Anhang H (informativ) **Herstellung von RNS-Stammlösungen für die Verwendung als externe Kontrolle (EC-RNS)** **36**

Anhang I (informativ) **Plattenbelegung** **38**

Anhang J (informativ) **Ergebnisse der laborübergreifenden Studie** **39**

Literaturhinweise **51**

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 15216-1:2015) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Lebensmittelerzeugnissse“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

ISO 15216 besteht aus den folgenden Teilen unter dem allgemeinen Titel *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zur Bestimmung des Hepatitis A-Virus und Norovirus in Lebensmitteln mittels Real-time RT-PCR*:

— *Teil 1: Verfahren zur Quantifizierung*

— *Teil 2: Verfahren für den qualitativen Nachweis* (Technische Spezifikation)

Diese Ausgabe annulliert und ersetzt ISO/TS 15216-1:2013, die technisch überarbeitet wurde.

Wichtige Änderungen in dieser Ausgabe:

— Verwendung von linearen dsDNS-Molekülen für die Quantifizierung vorgeschrieben;

— Verwendung eines geeigneten Puffers für die Verdünnung von Kontrollmaterialien vorgeschrieben;

— Änderung des Verfahrens zur Erzeugung von Prozesskontrollvirus-RNA für die Standardkurve;

— Hinzufügung von Haltepunkten in den Extraktionsverfahren;

— Änderung an der Terminologie von Amplifikationseffizienz zu Inhibition der RT-PCR;

— Hinzufügung von zusätzlichen Real-time RT-PCR für negative Kontrollen;

— Präzisionsdaten und Ergebnisse einer laborübergreifenden Studie.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 15216-1:2015 wurde vom CEN als prEN ISO 15216-1:2015 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Einleitung

Das Hepatitis A-Virus (HAV) und Noroviren (NoV) sind wichtige Erreger von lebensmittelbedingten Viruserkrankungen beim Menschen. Bislang gibt es keine Routineverfahren zur Kultivierung dieser Viren aus Lebensmitteln. 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 RNS-Präparate erhalten werden. Von Lebensmitteloberflächen werden die Viren mit einem Tupfer entnommen. Bei Weichobst (Beeren) und Salaten 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) werden die Viren aus dem Gewebe der Verdauungsdrüsen durch Behandlung mit einer Proteinase K-Lösung isoliert. Bei allen Matrices, die nicht in dieser Technischen Spezifikation aufgeführt sind, ist es notwendig, dieses Verfahren zu validieren. Für sämtliche Matrices wird ein einheitliches RNS-Extraktionsverfahren verwendet, das auf dem Aufschluss des Viruskapsids mittels chaotroper Reagenzien und anschließender Adsorption der Nukleinsäuren an eine Silica-Matrix beruht. Bei der Real-time RT-PCR wird die Amplifikation während des PCR-Zyklus durch Messung der Anregung von fluoreszenzmarkierten Molekülen sichtbar gemacht. Bei der 5'-Nuklease Real-time RT-PCR-Reaktion wird eine sequenzspezifische, mit Fluoreszenzmarkern gekoppelte Nukleotidsonde (Hydrolysesonde) verwendet, die auch eine simultane Bestätigung der Zielsequenz ermöglicht. Diese Modifikation erhöht die Empfindlichkeit und Spezifität des PCR-Verfahrens und erübrigt zusätzliche Schritte zur Verifizierung des Amplifikationsergebnisses. Aufgrund der Komplexität des Verfahrens ist es notwendig, einen umfassenden Satz von Kontrollen mitzuführen. Das in diesem Teil von ISO 15216 beschrieben Verfahren ermöglicht die quantitative Bestimmung des Gehalts an Virus-RNS in der Untersuchungsprobe. Eine schematische Darstellung des Verfahrens wird in Anhang A gegeben.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

1 Anwendungsbereich

In diesem Teil von ISO 15216 wird ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Gehalts an RNS von HAV und NoV der Genogruppen I (GI) und II (GII) in Untersuchungsproben von Lebensmitteln (Weichobst, Salat, in Flaschen abgefülltes Trinkwasser, zweischalige Weichtiere (Muscheln)) oder Lebensmitteloberflächen beschrieben. Nach der Freisetzung der Viren aus der Untersuchungsprobe wird die virale RNS durch Aufschluss des Viruskapsids mit Guanidinthiocyanat und Adsorption an Silica(-Partikel) extrahiert. Die Zielsequenzen innerhalb der viralen RNS werden amplifiziert und mittels Real-time RT-PCR nachgewiesen.

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

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 in ISO 22174 sowie die folgenden Begriffe.

3.1
Lebensmittel
Stoff, der als Nahrungsmittel verwendet wird oder für die Verwendung als Nahrungsmittel zubereitet wird

ANMERKUNG Für die Anwendung dieses Teils von ISO 15216 schließt diese Definition in Flaschen abgefülltes Trinkwasser ein.

3.2
Lebensmitteloberfläche
Oberfläche des Lebensmittels, Oberfläche, auf der die Lebensmittelzubereitung erfolgt oder mit Lebensmitteln in Berührung kommende Fläche

3.3
Hepatitis-A-Virus
HAV
zur Familie der *Picornaviridae* gehörendes Virus, das infektiöse Hepatitis verursacht

ANMERKUNG 1 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 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 Viruträgern. Das Hepatitis A-Virus 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.

3.4
Norovirus
zur Familie der *Caliciviridae* gehörendes Virus, das sowohl sporadische Fälle als auch große Ausbrüche von akuter Gastroenteritis verursacht

ANMERKUNG 1 Aus genetischer Sicht kann das Norovirus in sieben einzelne Genogruppen unterteilt werden.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

ANMERKUNG 2 Drei dieser Genogruppen, GI, GII und GIV, wurden mit gastrointestinalen Erkrankungen beim Menschen in Verbindung gebracht. GI und GII sind für die überwiegende Mehrheit der klinischen Fälle verantwortlich. 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 Viruträgern. Noroviren der Genogruppen I und II 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.

3.5
quantitative Bestimmung des Hepatitis A-Virus
Abschätzung der Anzahl der Kopien von HAV-RNS in einer zuvor festgelegten Menge, einem zuvor festgelegten Volumen eines Lebensmittels oder einem zuvor festgelegten Flächeninhalt einer Lebensmitteloberfläche

3.6
quantitative Bestimmung des Norovirus
Schätzung der Anzahl der Kopien von Norovirus-RNS in einer zuvor festgelegten Menge, einem zuvor festgelegten Volumen eines Lebensmittels oder einem zuvor festgelegten Flächeninhalt einer Lebensmitteloberfläche

3.7
Prozesskontrollvirus
vor der Virusextraktion zur Untersuchungsprobe hinzugefügtes Virus, um die Extraktionseffizienz zu überprüfen

3.8
Prozesskontrollvirus-RNS
aus dem Prozesskontrollvirus extrahierte RNS für die Generierung einer Standardkurve zur Abschätzung der Extraktionseffizienz

3.9
negative RNS-Extraktionskontrolle
Kontrolle ohne Ziel-RNS, mit der sämtliche Schritte der Nukleinsäureextraktion durchgeführt werden, um eventuelle Kreuzkontaminationen zu erfassen

3.10
negative Prozesskontrolle
Probe der Lebensmittelmatrix ohne pathogenen Zielkeim, die sämtliche Stufen des analytischen Prozesses durchläuft

3.11
Hydrolysesonde
Fluoreszenzsonde, die mit zwei Fluoreszenzmarkern gekoppelt ist, die während des Amplifikationsprozesses, bedingt durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms, sterisch voneinander getrennt werden

3.12
negative RT-PCR-Kontrolle
Kontrolle zur Überprüfung der Real-time RT-PCR-Reagenzien auf eine eventuelle Kontamination, bei der anstelle von Proben-RNS ein Anteil hochreines Wasser in die Real-time RT-PCR eingesetzt wird

3.13
externe Kontroll-RNS
Referenz-RNS, die die Zielsequenz für die entsprechende Real-time RT-PCR beinhaltet, z. B. eine durch *in vitro*-Transkription von einem Plasmid synthetisierte RNS, die in einer definierten Menge dem Reaktionsansatz (zusätzlich zur Proben-RNS) hinzugefügt wird und in einem gesonderten RT-PCR-Reaktionsansatz als Amplifikationskontrolle dient

3.14
C_q-Wert
Zykluswert; der PCR-Zyklus, bei dem das Zielmolekül in der Real-time-PCR quantitativ bestimmt wird

ANMERKUNG Das entspricht dem Wert, bei dem die Fluoreszenz der Reaktion einen Schwellenwert überschreitet.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

3.15
Nachweisgrenze
LOD
niedrigste Konzentration des Zielmoleküls in einer Untersuchungsprobe, die unter den im Verfahren festgelegten Versuchsbedingungen reproduzierbar nachgewiesen werden kann (95 %-Konfidenzintervall), wie durch einen Ringversuch oder eine andere Validierung gezeigt wurde

ANMERKUNG Die LOD ist abhängig von der eingesetzten Probenmenge und der Qualität des RNS-Extraktes.

3.16
Bestimmungsgrenze
LOQ
niedrigste Konzentration des Zielmoleküls in einer Untersuchungsprobe, die unter den im Verfahren festgelegten Versuchsbedingungen mit ausreichender Präzision und Genauigkeit quantitativ bestimmt werden kann, wie durch einen Ringversuch oder eine andere Validierung gezeigt wurde.

ANMERKUNG Die LOQ ist abhängig von der eingesetzten Probenmenge und der Qualität des RNS-Extraktes.

4 Kurzbeschreibung

4.1 Virusgewinnung

Die von diesem Teil von ISO 15216 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. Die Wahl des Verfahrens ist abhängig von der jeweiligen Untersuchungsmatrix.

4.2 RNS-Extraktion

Es ist notwendig, für die RNS-Extraktion ein Verfahren auszuwählen, das zu einem reinen RNS-Extrakt führt und vorhandene RT-PCR-Inhibitoren eliminiert. In diesem Teil von ISO 15216 wird das chaotrope Agens Guanidinthiocyanat verwendet, um das Viruskapsid aufzubrechen. Die freigesetzte RNS wird anschließend an Silica (Siliciumdioxid) adsorbiert und durch mehrere Waschschritte gereinigt. Die gereinigte virale RNS wird vor der Real-time-RT-PCR von der Silica-Matrix in eine Pufferlösung eluiert.

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

In diesem Teil von ISO 15216 wird eine einstufige Real-time RT-PCR unter Verwendung einer Hydrolysesonde angewendet. Bei der einstufigen Real-time RT-PCR werden reverse Transkription und PCR-Amplifikation nacheinander im selben Reaktionsgefäß durchgeführt.

Bei der Real-time-PCR unter Verwendung einer Hydrolysesonde wird eine kurze DNS-Sonde verwendet, an deren gegenüberliegenden Enden je ein Fluoreszenzmarker und ein Fluoreszenzquencher gebunden sind. Die Chemie des Reaktionsansatzes stellt sicher, dass die Sonde während der Amplifikation abgebaut wird und das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des Amplifikationsproduktes ansteigt. Die Fluoreszenz kann während des Zyklus auf jeder Stufe gemessen werden. Der erste Punkt eines PCR-Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz überschreitet, entspricht der Ausgangsmenge an RNS in der Probe und ermöglicht somit die quantitative Bestimmung der Ziel-RNS in der Probe.

Aufgrund der oft in Lebensmitteln vorliegenden geringen Mengen an Zielviren und der Diversität der einzelnen Virusstämme ist es von Bedeutung, sowohl geeignete Reagenzien für die einstufige 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 Teils von ISO 15216 verwendet wurden) sind in den Anhängen B und C angeführt.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

4.4 Kontrollmaterialien

4.4.1 Prozesskontrollvirus

Verluste an Zielviren können auf verschiedenen Stufen bei der Virusgewinnung aus der Probe und der RNS-Extraktion auftreten. Um diese Verluste mit zu erfassen, werden die Proben vor der Aufarbeitung 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 Virus mit einem einzelsträngigen Genom 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 Kontrollvirus muss sich genetisch hinreichend von den Zielviren unterscheiden, damit keine Kreuzreaktion auftritt, und es sollte naturgemäß in den zu untersuchenden Lebensmitteln nicht vorkommen.

Ein Beispiel zur Herstellung eines Prozesskontrollvirus (das bei der Erarbeitung dieses Teils von ISO 15216 verwendet wurde) ist in Anhang D angeführt.

4.4.2 Doppelsträngige DNS-Kontrolle (dsDNS-Kontrolle)

Zur quantitativen Bestimmung eines Zielvirus müssen die Ergebnisse in Bezug zu einem Standard bekannter Konzentration gesetzt werden. Zur Erstellung einer Standardkurve in Genomkopien je Mikroliter muss eine Verdünnungsreihe mit doppelsträngiger DNS, die die zu bestimmende Zielsequenz (5.3.11) enthält und mit einem geeigneten Verfahren, z. B. spektrophotometrisch, fluorimetrisch, digitale PCR usw., quantifiziert wurde, verwendet werden. Die Standardkurve ermöglicht die quantitative Bestimmung der Probe in nachweisbaren Virusgenomkopien je Mikroliter.

4.4.3 Externe RNS-Amplifikationskontrolle (EC)

Viele Lebensmittel 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 RNS, die die zu bestimmende Zielsequenz enthält (5.3.12), als externe Kontrolle (EC) dem Reaktionsansatz zusätzlich zur Proben-RNS hinzugefügt und mittels RT-PCR analysiert. Der Vergleich des PCR-Ergebnisses dieses Ansatzes mit dem Ergebnis des Reaktionsansatzes, bei dem nur die EC-RNS, jedoch keine Proben-RNS zugegeben wurde, ermöglicht die Bestimmung des Grades der Inhibition der RT-PCR in jeder einzelnen Untersuchungsprobe.

Die Verwendung eines alternativen Verfahrens für die RT-PCR-Inhibitionskontrolle ist zulässig, wenn nachweislich eine gleichwertige Stringenz wie bei dem hier beschriebenen Verfahren 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.

Zur üblichen Laborpraxis siehe ISO 7218.[1]

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

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 (NaCl).

5.2.5 Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4).

5.2.6 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4).

5.2.7 TRIS als Base.

5.2.8 Glycin.

5.2.9 Rindfleischextrakt in Pulverform.

5.2.10 Proteinase K (30 U/mg).

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

5.2.12 Chloroform.

5.2.13 Butanol.

5.2.14 Natriumhydroxid (NaOH).

5.2.15 Salzsäure (HCl).

5.2.16 Ethylendiamintetraacetat (EDTA).

5.2.17 Silica, Lysis-, **Wasch-** und **Elutionspuffer** zur Extraktion der viralen RNS. Mit den Reagenzien müssen 500 µl Viruslösung verarbeitet werden können, wobei die Lyse mit einer chaotropen Pufferlösung erfolgt, die Guanidinthiocyanat enthält (Literaturhinweis [4]), und Silica als Matrix zur Bindung der RNS verwendet wird. Nach der Reinigung der Silica-gebundenen RNS mit Waschpuffer(n) wird die RNS in 100 µl Elutionspuffer eluiert.

Das RNS-Präparat muss hinsichtlich Qualität und Konzentration für den vorgesehenen Zweck geeignet sein. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zu den Reagenzien für die RNS-Extraktion (die bei der Erarbeitung des in diesem Teil von ISO 15216 beschriebenen Verfahrens verwendet wurden) siehe Anhang E.

5.2.18 Reagenzien für die einstufige Real-time RT-PCR. Die Reagenzien müssen gewährleisten, dass 5 µl RNS-Extrakt in einem Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl analysiert werden können. Sie müssen für die einstufige RT-PCR unter Verwendung von Hydrolysesonden (die verwendete DNS-Polymerase muss eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität aufweisen) geeignet und hinreichend empfindlich für den Nachweis von Virus-RNS-Konzentrationen sein, die üblicherweise in viruskontaminierten Lebensmitteln vorliegen. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zu den Reagenzien für die einstufige Real-time RT-PCR (die bei der Erarbeitung dieses Teils von ISO 15216 verwendet wurden) siehe Anhang B.

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 von Experten begutachteten Fachzeitschrift veröffentlicht und ihre Verwendung an einem breiten Spektrum an Virusstämmen getestet worden sein. Primer für den Nachweis von HAV müssen auf den 5'-nicht-codierenden Bereich des Genoms, 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 Teils von ISO 15216 verwendet wurden) siehe Anhang C.

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

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

5.3 Hergestellte Reagenzien

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

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

5.3.2 Chloroform/Butanol-Gemisch. Siehe F.2.

5.3.3 Proteinase K-Lösung. Siehe F.3.

5.3.4 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). Siehe F.4.

5.3.5 TRIS/Glycin/Rindfleischextrakt-Puffer (TGBE-Puffer). Siehe F.5.

5.3.6 1 M TRIS-Lösung. Siehe F.6.

5.3.7 0,5 M EDTA-Lösung. Siehe F.7.

5.3.8 TRIS EDTA-Puffer (TE-Puffer). Siehe F.8.

5.3.9 Virusmaterial für die Prozesskontrolle. Die Stammlösung des Prozesskontrollvirus ist mindestens mit einem Faktor von 1:10 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 und noch hinreichend konzentriert sein, um einen reproduzierbaren Nachweis der größten Verdünnung zu ermöglichen, die für die Standardkurve der Prozesskontrollvirus-RNS verwendet wird (8.4.2.2). Das verdünnte Virusmaterial für die Prozesskontrolle wird in Aliquots zur einmaligen Verwendung aufgeteilt und eingefroren bei −15 °C oder kälter aufbewahrt. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zur Herstellung des Virus für die Prozesskontrolle (das bei der Erarbeitung des in diesem Teil von ISO 15216 beschriebenen Verfahrens verwendet wurde) siehe Anhang D.

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 pro Reaktion 20 µl Mastermix für ein Gesamtreaktionsvolumen von 25 µl zu erhalten. Die optimalen Konzentrationen an Primern und Sonde sind in Anlehnung an den Empfehlungen des Reagenzienherstellers zu bestimmen. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zu den Real-time RT-PCR-Mastermixen (die bei der Erarbeitung dieses Teils von ISO 15216 verwendet wurden) siehe Anhang B.

5.3.11 Doppelsträngiges DNS-Kontrollmaterial (dsDNS-Kontrollmaterial). Als dsDNS-Kontrolle sind aufgereinigte, lineare DNA-Moleküle, die die Zielsequenz für das jeweilige Zielvirus enthalten, zu verwenden. Die Sequenz der DNA-Moleküle ist vor der Verwendung zu überprüfen. Die Plasmid-Präparate dürfen zu keiner Inhibition in der RT-PCR führen. Die Konzentration der jeweiligen dsDNS-Stammlösung ist zu bestimmen und in DNA-Kopien je Mikroliter anzugeben. 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 DNA-Kopien je Mikroliter einzustellen. Da EDTA zu einer Inhibition in der RT-PCR führen kann, dürfen die zur Verdünnung der dsDNS verwendeten Puffer keine EDTA-Konzentrationen von mehr als 1 mM enthalten. Das verdünnte dsDNS-Präparat (dsDNS-Kontrollmaterial) wird in Aliquots zur einmaligen Verwendung aufgeteilt und eingefroren bei −15 °C oder kälter aufbewahrt. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zur Herstellung der dsDNS (die bei der Erarbeitung dieses Teils von ISO 15216 verwendet wurde) siehe Anhang G.

5.3.12 RNS-Kontrollmaterial für die externe Kontrolle (EC). Als externe Kontroll-RNS ist aufgereinigte ssRNS, die die Zielsequenz für das jeweilige Zielvirus enthält, zu verwenden. Die Kontamination mit Ziel-DNS darf höchstens 0,1 % betragen und die RNS-Kontrolle darf in der RT-PCR zu keiner Inhibition führen. Die Konzentration der jeweiligen EC-RNS-Stammlösung ist in Kopien je Mikroliter anzugeben. 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 DNA-Kopien je Mikroliter einzustellen. Da EDTA zu einer Inhibition in der RT-PCR führen können, dürfen die zur Verdünnung der EC-RNS verwendeten Puffer keine EDTA-Konzentrationen von mehr als 1 mM enthalten. Das verdünnte EC-RNS-Präparat (EC-RNS-Kontrollmaterial) wird in Aliquots zur einmaligen Verwendung aufgeteilt und eingefroren bei −15 °C oder kälter aufbewahrt. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zur Herstellung von EC-RNS (die bei der Erarbeitung dieses Teils von ISO 15216 verwendet wurde) siehe Anhang H.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

6 Geräte und Materialien

Zusätzlich zur üblichen Grundausstattung für mikrobiologische Laboratorien (ISO 7218)[1] wird Folgendes benötigt.

6.1 Mikropipetten und **Spitzen** verschiedener Größen, z. B. 1 000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl. Es sollten aerosol-dichte Spitzen verwendet werden, es sei denn, Spitzen ohne Filter werden benötigt, z. B. für die Absaugung.

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

6.3 Vortex-Mischer.

6.4 Schüttelgerät, das bei konstanten Wippbewegungen von etwa 500 min^{-1} betrieben werden kann.

6.5 Schüttelinkubator, der bei (37 ± 2) °C und konstanten Wippbewegungen von (320 ± 20) min^{-1} betrieben werden kann, oder ein gleichwertiges Gerät.

6.6 Wipptisch(e) oder ein gleichwertiges Gerät zur Anwendung bei Raumtemperatur und (5 ± 3) °C und bei konstanten Wippbewegungen von (60 ± 5) min^{-1}.

6.7 Ansaugvorrichtung oder ein gleichwertiges Gerät zum Entfernen des Überstandes.

6.8 Wasserbad, das bei (60 ± 2) °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 × *g* bei (5 ± 3) °C für die Verwendung von Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von mindestens 35 ml Volumen;

b) 10 000 × *g* bei (5 ± 3) °C für die Verwendung von schmalen (15 mm ist zu groß) chloroformbeständigen Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von mindestens 1 ml Volumen;

c) 4 000 × *g* bei Raumtemperatur für Zentrifugal-Konzentratoren (6.16).

6.10 Mikrozentrifuge.

6.11 Zentrifugen- und Mikrozentrifugenröhrchen und -flaschen verschiedener Größen, 1,5 ml, 5 ml, 15 ml, 50 ml, usw. Es werden schmale (15 mm ist zu groß), chloroformbeständige Röhrchen mit einem Fassungsvermögen von 1 ml benötigt.

6.12 pH-Meter (oder pH-Teststreifen).

6.13 Sterile Wattetupfer.

6.14 Gewebefilterbeutel (400 ml).

6.15 Positiv geladene Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Durchmesser 47 mm).

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

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

6.18 Steriles Austernmesser zum Öffnen von zweischaligen Weichtieren (BMS).

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

6.19 Gummiblock zum Öffnen der BMS.

6.20 Scheren.

6.21 Pinzetten.

6.22 Sterile Petrischalen.

6.23 Rasierklingen oder ein gleichwertiges Homogenisierungsgerät.

6.24 Schutzhandschuhe für hohe Beanspruchung.

6.25 RNS-Extraktions-System geeignet für Extraktionsverfahren unter Verwendung von Silica und zugehörigen Reagenzien (5.2.17). Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zum RNS-Extraktions-System (das bei der Erarbeitung des in diesem Teil von ISO 15216 beschriebenen Verfahrens verwendet wurde) siehe Anhang E.

6.26 Real-time-PCR-Gerät(e), d. h. Thermocycler, ausgestattet mit einer Energiequelle, die für die Anregung von Fluoreszenzmolekülen geeignet ist, und einem optischen Nachweissystem für den Echtzeitnachweis der während der PCR durch Hydrolyse der Sonde erzeugten Fluoreszenzsignale.

6.27 Verbrauchsmaterialien für die Real-time RT-PCR, z. B. PCR-Platten und Folien bzw. Verschlüsse, die für das gewählte Real-time-PCR-Gerät geeignet sind.

7 Probenahme

Wenn keine spezifische Internationale Norm vorliegt, die die Probenahme beschreibt, wird empfohlen, die Probenahme in Vereinbarung mit den Beteiligten durchzuführen.

Es ist wichtig, dass das Labor eine wirklich repräsentative Probe erhält, die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde.

8 Durchführung

8.1 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien

Die Probenaufbereitung und die PCR müssen in getrennten Arbeitsbereichen oder -räumen durchgeführt werden, wie in ISO 22174 festgelegt.

8.2 Virusgewinnung

Die Wahl des Verfahrens hängt von der zu untersuchenden Lebensmittelmatrix ab.

8.2.1 Virusmaterial für die Prozesskontrolle

Unmittelbar vor der Aufarbeitung der Untersuchungsproben werden entsprechend der Anzahl an Untersuchungsproben ausreichend Aliquots mit Kontrollvirusmaterial (5.3.10) aufgetaut und vereinigt (10 µl Prozesskontrollvirus je Untersuchungsprobe plus 25 µl Überschuss).

Ein Menge von (20 ± 0,5) µl des vereinten Prozesskontrollvirusmaterials wird für die RNS-Extraktion für die Erstellung der Standardkurve der Prozesskontrollvirus-RNS bei (5 ± 3) °C (für höchstens 24 h) oder eingefroren bei −15 °C oder kälter (bei längerer Lagerung) aufbewahrt (8.4.2.2).

8.2.2 Negative Prozesskontrolle

Parallel zu den Untersuchungsproben werden negative Prozesskontrollen mitgeführt, deren Häufigkeit innerhalb des Qualitätssicherungsprogramms des Untersuchungslabors festgelegt wird.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

8.2.3 Lebensmitteloberflächen

Mit einem zuvor in PBS (5.3.4) angefeuchteten sterilen Wattetupfer wird die zu untersuchende Oberfläche (maximale Fläche von 100 cm^2) mit leichtem Druck zum Ablösen der Viruspartikel intensiv abgetupfert. Die Quadratzentimeter der Fläche, die abgetupfert wurde, werden geschätzt und dokumentiert.

Der Tupfer muss unverzüglich weiter verarbeitet oder in einem geeigneten Behälter bei (5 ± 3) °C für bis zu 7 Tage aufbewahrt werden.

Es werden (10 ± 0,1) µl Virusmaterial für die Prozesskontrolle (8.2.1) zu dem Tupfer hinzugefügt. Unmittelbar nach der Zugabe des Prozesskontrollvirusmaterials wird der Tupfer in ein Röhrchen mit (490 ± 5) µl Lysispuffer getaucht. Anschließend wird er an der Wand des Röhrchens ausgepresst, um die Flüssigkeit freizusetzen. Das Eintauchen und Auspressen wird drei- bis viermal wiederholt, um die maximale Ausbeute an Viren zu gewährleisten.

Danach wird unverzüglich die RNS-Extraktion durchgeführt.

8.2.4 Weichobst und Salate

Weichobst und Salate für die Analyse müssen frisch oder eingefroren sein und dürfen nur, wie z. B. bei Fertigsalaten, zerkleinert oder geschnitten, aber nicht anderweitig verarbeitet sein. An der Oberfläche anhaftender Schmutz muss vor der Analyse schonend entfernt werden, aber ohne die Untersuchungsproben in Wasser einzutauchen.

(25 ± 0,3) g Weichobst oder Salat werden grob in Stücke von etwa 2,5 cm × 2,5 cm × 2,5 cm zerkleinert (eine Zerkleinerung ist nicht notwendig, wenn zum Beispiel die einzelnen Früchte kleiner sind) und in die Probenkammer eines 400-ml-Gewebefilterbeutels überführt.

(40 ± 1) ml TGBE-Puffer (5.3.5) (bei Weichobstproben werden 30 Einheiten Pektinase von *A. niger* oder 1 140 Einheiten Pektinase von *A. aculeatus* zur Pufferlösung hinzugegeben) und (10 ± 0,1) µl Virusmaterial für die Prozesskontrolle (8.2.1) werden hinzugefügt.

Die Inkubation erfolgt für (20 ± 1) min bei Raumtemperatur und einer konstanten Wippbewegung bei etwa 60 min^{-1}. Bei saurem Weichobst muss der pH-Wert der Lösung während der Inkubation in Abständen von 10 min überprüft werden. Wenn der pH auf einen Wert unter 9,0 fällt, muss er mit NaOH auf 9,5 ± 0,5 eingestellt werden. Die Inkubationszeit ist für jedes Mal, wenn der pH-Wert eingestellt wurde, um weitere 10 min zu verlängern. Der pH-Wert darf nicht öfter als drei Mal je Probe eingestellt werden. Die Lösung aus der Filtratkammer wird in ein Zentrifugenröhrchen dekantiert (bei Bedarf werden zwei Röhrchen verwendet, um das Volumen aufzunehmen).

Es wird (30 ± 5) min bei 10 000 × *g* und (5 ± 3) °C zentrifugiert.

Der Überstand wird in ein einzelnes neues Röhrchen oder eine einzelne neue Flasche dekantiert und der pH-Wert mit HCl auf 7,0 ± 0,5 eingestellt.

25 Volumenanteile 5-fach konzentrierter PEG/NaCl-Lösung (5.3.1) werden hinzugefügt (um eine Endkonzentration von 100 g/l PEG und 0,3 mol/l NaCl zu erhalten) und es wird durch Schütteln für (60 ± 5) s gut gemischt. Anschließend wird (60 ± 5) min bei (5 ± 3) °C und einer konstanten Wippbewegung von etwa 60 min^{-1} inkubiert.

Es wird (30 ± 5) min bei 10 000 × *g* und (5 ± 3) °C zentrifugiert (bei Bedarf wird das Volumen auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt).

Der Überstand wird dekantiert und verworfen. Anschließend wird weitere (5 ± 1) min bei 10 000 × *g* und (5 ± 3) °C zentrifugiert, um das Pellet zu verdichten.

Der Überstand wird verworfen und das Pellet in (500 ± 10) µl PBS (5.3.4) resuspendiert. Bei Proben, die nach dem Zentrifugieren große Pellets bilden, kann ein größeres Volumen von bis zu (1 000 ± 10) µl PBS erforderlich sein, um das Pellet vollständig zu resuspendieren. Wenn eine Einzelprobe auf zwei Röhrchen aufgeteilt wurde, werden beide Pellets schrittweise in dem gleichen Aliquot PBS resuspendiert.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Bei der Virusgewinnung aus Salaten wird die Suspension in ein geeignetes Röhrchen überführt und für die RNS-Extraktion zurückgestellt. Der Probenextrakt muss unverzüglich weiter verarbeitet oder bei (5 ± 3) °C für bis zu 48 h aufbewahrt werden.

Für eine Langzeitaufbewahrung wird eine Temperatur von -15 °C oder kälter empfohlen.

Bei der Virusgewinnung aus Weichobst ist ein weiterer Klärungsschritt erforderlich. Die Suspension wird in ein schmales, chloroformbeständiges Zentrifugenröhrchen (6.11) überführt. Es werden (500 ± 10) µl Chloroform-/Butanol-Gemisch (5.3.2) hinzugefügt und mit dem Vortex-Mischer gemischt. Anschließend wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wenn für die Resuspension des Pellets mehr als 500 µl PBS verwendet werden, wird das entsprechende Volumen Chloroform-/Butanol-Gemisch hinzugefügt.

Es wird (15 ± 1) min bei 10 000 × *g* und (5 ± 3) °C zentrifugiert. Die wässrige Phase wird vorsichtig in ein frisches Röhrchen überführt und für die RNS-Extraktion zurückgestellt. Der Probenextrakt muss unverzüglich weiter verarbeitet oder bei (5 ± 3) °C für bis zu 48 h aufbewahrt werden.

Für eine Langzeitaufbewahrung wird eine Temperatur von -15 °C oder kälter empfohlen.

8.2.5 In Flaschen abgefülltes Trinkwasser

Dieser Teil von ISO 15216 ist für Volumina von bis zu 5 l geeignet. Für jede Probe ist das Volumen der Untersuchungsprobe zu dokumentieren.

Es werden (10 ± 0,1) µl Virusmaterial für die Prozesskontrolle (8.2.1) zur Untersuchungsprobe hinzugefügt. Zum Mischen wird geschüttelt.

Bei Verwendung einer Vakuum- oder Überdruckvorrichtung (6.17) wird das gesamte Probenvolumen steril durch einen positiv geladenen Membranfilter mit einem Durchmesser von 47 mm filtriert (6.15). Der Filter wird in ein steriles Röhrchen überführt. Anschließend werden (4 ± 0,1) ml TGBE-Puffer (5.3.5) hinzugefügt.

In die leere Wasserflasche werden (10 ± 0,2) ml TGBE-Puffer gegeben. Röhrchen und Flasche werden (20 ± 5) min bei konstanten Wippbewegungen von etwa 500 min^{-1} geschüttelt.

Die Eluate aus dem Röhrchen und der Flasche werden in einem einzelnen neuen Röhrchen vereint.

Die Innenwände der Flasche werden mit weiteren (2 ± 0,1) ml TGBE-Puffer gespült, indem vorsichtig geschüttelt und mit der Hand umgedreht wird. Diese Lösung wird zu den Eluaten in das Röhrchen gegeben.

Die Eluate werden mit HCl mit einer Konzentration von 0,1 mol/l auf einen pH-Wert von 7,0 ± 0,5 eingestellt und in einen Zentrifugal-Konzentrator (6.16) überführt.

Es wird (15 ± 1) min bei 4 000 × *g* zentrifugiert. Das Konzentrat wird in ein neues Röhrchen überführt.

Das Volumen wird mit PBS (5.3.4) auf (500 ± 10) µl eingestellt. Die Lösung wird für die RNS-Extraktion zurückgestellt. Der Probenextrakt muss unverzüglich weiter verarbeitet oder bei (5 ± 3) °C für bis zu 48 h aufbewahrt werden.

Für eine Langzeitaufbewahrung wird eine Temperatur von -15 °C oder kälter empfohlen.

8.2.6 Zweischalige Weichtiere (en: bivalve molluscan shellfish, BMS)

Zu untersuchende BMS müssen lebend oder, falls eingefroren, unbeschädigt sein. Sie dürfen nicht gekocht oder anderweitig mit Wärme behandelt worden sein. An der Schale anhaftender Schmutz wird entfernt. BMS dürfen nicht zurück ins Wasser gegeben werden.

Die Schalen von mindestens 10 BMS werden mit einem sterilen Austernmesser geöffnet. Es ist darauf zu achten, dass beim Öffnen der Schalen Schutzhandschuhe, die einer hohen Beanspruchung standhalten, getragen werden. Hierbei wird das Tier auf einem Gummiblock stabilisiert.

Die Verdauungsdrüsen von allen Tieren werden mit Schere und Pinzette oder ähnlichen Materialien herauspräpariert und in eine saubere Petrischale überführt. Es ist eine Mindestmenge von (2,0 ± 0,2) g an vereintem Drüsengewebe erforderlich.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Die Verdauungsdrüsen werden mit einer Rasierklinge oder einem gleichwertigen Homogenisierungsmaterial bis zu einer pastenähnlichen Konsistenz fein zerkleinert. Anschließend wird eine Menge von (2,0 ± 0,2) g in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Verbleibendes Drüsengewebe kann langfristig bei -15 °C oder kälter aufbewahrt werden.

Es werden (10 ± 0,1) µl Virusmaterial für die Prozesskontrolle (8.2.1) hinzugefügt.

(2,0 ± 0,2) ml Proteinase K-Lösung (5.3.3) werden hinzugefügt und es wird gemischt. Unter Schütteln bei konstanten Wippbewegungen von ca. 320 min^{-1} wird (60 ± 5) min bei (37 ± 2) °C in einem Schüttelinkubator oder ähnlichem Gerät inkubiert.

Anschließend wird (15 ± 1) min bei (60 ± 2,0) °C in einem Wasserbad oder ähnlichem Gerät inkubiert.

Es wird bei Raumtemperatur (5,0 ± 0,5) min bei 3 000 × *g* zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Röhrchen dekantiert. Das Volumen des Überstandes wird in Milliliter gemessen und dokumentiert. Der Überstand wird für die RNS-Extraktion verwendet und muss unverzüglich weiter verarbeitet oder bei (5 ± 3) °C für bis zu 7 Tage aufbewahrt werden.

Für eine Langzeitaufbewahrung wird eine Temperatur von -15 °C oder kälter empfohlen.

8.3 RNS-Extraktion

Die RNS wird mit einem geeigneten Verfahren, das auf dem Aufschluss mit Guanidinthiocyanat und der Adsorption an Silica beruht, aus (500 ± 10) µl Probenmaterial (BMS) bzw. aus der gesamten Probe (andere Matrices) extrahiert. Die gereinigte RNS wird in (100 ± 2) µl Elutionspuffer eluiert und für die Analyse mit der Real-time RT-PCR zurückgestellt. Die extrahierte RNS muss unverzüglich weiter verarbeitet oder bei (5 ± 3) °C für bis zu 24 h bzw. bei −15 °C oder kälter für bis zu 6 Monate aufbewahrt werden.

Für eine Langzeitaufbewahrung wird eine Temperatur von -15 °C oder kälter empfohlen.

Bei jedem Satz an Untersuchungsproben muss eine negative Extraktionskontrolle mitgeführt werden, es sei denn, es ist bereits eine negative Prozesskontrolle (8.2.2) mitenthalten. Die RNS-Extraktion der negativen Extraktionskontrolle muss unter Anwendung desselben Verfahrens wie bei den Proben mit (500 ± 10) µl Wasser (5.2.1) erfolgen.

Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zum Verfahren für die RNS-Extraktion (das bei der Erarbeitung des in diesem Teil von ISO 15216 beschriebenen Verfahrens verwendet wurde) siehe Anhang E.

8.4 Real-time RT-PCR

8.4.1 Allgemeine Anforderungen

Die Mindestanforderungen an die Amplifikation und den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen mittels Real-time-PCR sind in ISO 22174 festgelegt.

8.4.2 Real-time RT-PCR

In diesem Teil von ISO 15216 sind Verfahren für den Nachweis von HAV, Norovirus der Genogruppe I und Norovirus der Genogruppe II beschrieben.

Unter bestimmten Voraussetzungen ist die Untersuchung der Untersuchungsprobe auf alle drei Viren nicht notwendig. Das Verfahren, das im Folgenden beschrieben ist, ermöglicht den Nachweis eines einzelnen Virus (d. h. HAV, Norovirus der Genogruppe I oder Norovirus der Genogruppe II) in einer Untersuchungsprobe mit sämtlichen mitzuführenden Kontrollen. Laboratorien, die auf mehr als ein Zielvirus untersuchen möchten, müssen das Reaktionsformat entsprechend anpassen. Eine typische Plattenbelegung ist in Anhang I angeführt. Die Verwendung eines alternativen Verfahrens für die RT-PCR-Inhibitionskontrolle ist zulässig, wenn nachweislich eine gleichwertige Stringenz wie bei der Verwendung von EC-RNS erzielt wird

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

8.4.2.1 Untersuchung auf das Zielvirus

Von jedem Proben-RNS-Extrakt werden Verdünnungen von 10^{-1} in Wasser (5.2.1) hergestellt.

Vom dsDNS-Kontrollmaterial (5.3.11) werden Verdünnungen von 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} und 10^{-4} in einem geeigneten Puffer, z. B. TE-Puffer (5.3.8) hergestellt. Da EDTA zu einer Inhibition in der RT-PCR führen kann, dürfen die zur Verdünnung der dsDNS verwendeten Puffer keine EDTA-Konzentrationen von mehr als 1 mM enthalten.

Für jede Untersuchungsprobe werden vorbereitet:

— zwei Vertiefungen einer PCR-Platte mit (5 ± 0,1) µl unverdünnter Proben-RNS;

— zwei Vertiefungen mit (5 ± 0,1) µl einer Verdünnung der Proben-RNS von 10^{-1};

— eine Vertiefung mit (5 ± 0,1 µl) unverdünnter Proben-RNS und (1 ± 0,05) µl unverdünnter EC-RNS (5.3.12);

— eine Vertiefung mit (5 ± 0,1 µl) einer Verdünnung der Proben-RNS von 10^{-1} und (1 ± 0,05) µl unverdünnter EC-RNS.

Für die EC-RNS-Kontrolle wird vorbereitet:

— eine Vertiefung mit (5 ± 0,1) µl Wasser (5.2.1) und (1 ± 0,05) µl unverdünnter EC-RNS.

Für die dsDNS-Standardkurve werden vorbereitet:

— zwei Vertiefungen mit (5 ± 0,1) µl unverdünnter dsDNS;

— zwei Vertiefungen mit (5 ± 0,1) µl einer Verdünnung der dsDNS von 10^{-1};

— zwei Vertiefungen mit (5 ± 0,1) µl einer Verdünnung der dsDNS von 10^{-2};

— zwei Vertiefungen mit (5 ± 0,1) µl einer Verdünnung der dsDNS von 10^{-3};

— zwei Vertiefungen mit (5 ± 0,1) µl einer Verdünnung der dsDNS von 10^{-4}.

Für die Negativkontrollen werden vorbereitet:

— zwei Vertiefungen mit (5 ± 0,1) µl Wasser (5.2.1);

— zwei Vertiefungen mit (5 ± 0,1) µl der negativen Extraktionskontrolle oder der RNS für die negative Prozesskontrolle.

In jede Vertiefung werden (20 ± 0,5) µl des entsprechenden Real-time RT-PCR-Mastermixes (5.3.10) hinzugefügt (der Mastermix kann auch vor Zugabe des Templates in die jeweiligen Vertiefungen gegeben werden).

8.4.2.2 Nachweis des Prozesskontrollvirus

Für jeden Satz an Untersuchungsproben werden (10 ± 0,1) µl Virusmaterial für die Prozesskontrolle einem Anteil von (500 ± 10) µl Wasser hinzugefügt. Die RNS wird daraus mit den gleichen Verfahren und unter den gleichen Bedingungen wie die Untersuchungsproben (8.3) extrahiert und aufbewahrt.

Es werden Verdünnungen der Prozesskontrollvirus-RNS von 10^{-1}, 10^{-2} und 10^{-3} in einem geeigneten Puffer, z. B. TE-Puffer (5.3.8), hergestellt. Da EDTA zu einer Inhibition in der RT-PCR führen kann, dürfen die zur Verdünnung der Prozesskontrollvirus-RNS verwendeten Puffer keine EDTA-Konzentration von mehr als 1 mM enthalten.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Für jede Untersuchungsprobe werden vorbereitet:

— eine Vertiefung mit (5 ± 0,1) µl unverdünnter Proben-RNS;

— eine Vertiefung mit (5 ± 0,1) µl einer Verdünnung der Proben-RNS von 10^{-1};

Für die Standardkurve der Prozesskontrollvirus-RNS werden vorbereitet:

— eine Vertiefung mit (5 ± 0,1) µl unverdünnter Prozesskontrollvirus-RNS;

— eine Vertiefung mit (5 ± 0,1) µl einer Verdünnung der Prozesskontrollvirus-RNS von 10^{-1};

— eine Vertiefung mit (5 ± 0,1) µl einer Verdünnung der Prozesskontrollvirus-RNS von 10^{-2};

— eine Vertiefung mit (5 ± 0,1) µl einer Verdünnung der Prozesskontrollvirus-RNS von 10^{-3}.

Für die Negativkontrollen werden vorbereitet:

— eine Vertiefung mit (5 ± 0,1) µl Wasser (5.2.1);

— eine Vertiefung mit (5 ± 0,1) µl der negativen Extraktionskontrolle oder der RNS für die negative Prozesskontrolle.

In jede Vertiefung werden (20 ± 0,5) µl des Real-time RT-PCR-Mastermixes für das Prozesskontrollvirus (5.3.10) hinzugefügt (der Mastermix kann auch vor Zugabe des Templates in die jeweiligen Vertiefungen gegeben werden).

8.4.2.3 Amplifikation

Die Platte wird einem Temperatur-Zeit-Programm unterzogen, das den initialen Schritt der reversen Transkription und mindestens 45 PCR-Zyklen unter Verwendung des PCR-Gerätes (6.26) beinhaltet. Dauer und Temperatur der einzelnen Schritte (reverse Transkription, RT-Deaktivierung, Denaturierung, Annealing, Elongation) sind abhängig von den verwendeten Reagenzien. Sie sollten auf den Empfehlungen des Herstellers beruhen, können jedoch weiter optimiert werden.

Bei Real-time-PCR-Geräten, bei denen der Zeitpunkt der Messung der Fluoreszenzdaten manuell eingestellt werden kann, muss das Gerät so eingestellt werden, dass die Fluoreszenzdaten am Ende der Elongationsphase erfasst werden.

Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zum Amplifikationsverfahren (das bei der Erarbeitung des in diesem Teil von ISO 15216 beschriebenen Verfahrens verwendet wurde) siehe Anhang B.

8.4.2.4 Analyse der Fluoreszenzdaten

Die Mindestanforderungen an die Auswertung von Amplifikationsdaten sind in ISO 22174 festgelegt. Die Amplifikationskurven sind gerätespezifisch und nach den Empfehlungen des Geräteherstellers zu analysieren. Der Schwellenwert muss so festgelegt werden, dass er diejenige Fläche schneidet, in der die Amplifikationskurven (logarithmische Darstellung) parallel zueinander verlaufen (exponentielle Phase).

Sämtliche Amplifikationskurven müssen überprüft werden, um falsch positive Ergebnisse zu identifizieren, die durch ein zu hohes oder ungleichmäßiges Hintergrundsignal bedingt sind (Reaktionen mit C_q-Werten ohne exponentielle Amplifikation). Dies ist zu dokumentieren und sämtliche derartigen Reaktionen sind als negativ zu bewerten. Außerdem müssen alle deutlich positiven Fluoreszenzkurven überprüft werden, um sicherzustellen, dass der von der Auswertesoftware erzeugte C_q-Wert bei dieser Reaktion der exponentiellen Phase der Amplifikation entspricht (und nicht durch ein hohes oder ungleichmäßiges Hintergrundsignal verfälscht ist). In dem Fall, dass die C_q-Werte verfälscht sind, müssen zusätzlich zu den von der Software erzeugten Werten korrigierte C_q-Werte aufgezeichnet werden. Für die quantitativen Berechnungen sind die korrigierten C_q-Werte zu verwenden.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

9 Auswertung der Ergebnisse

9.1 Allgemeines

Jede Kontrolle (dsDNS, EC-RNS, Prozesskontrollvirus-RNS) hat einen erwarteten zulässigen Wert oder Wertebereich. Wenn das verzeichnete Ergebnis für eine beliebige Kontrolle von dem zu erwartenden Ergebnis abweicht, müssen die Proben möglicherweise erneut untersucht werden.

Negative Kontrollen [Wasser (5.2.1) und negative Extraktions- oder Prozesskontrolle] müssen immer negativ sein. Wenn bei diesen Kontrollen ein positives Ergebnis verzeichnet wird, muss jede Probe, die zu einem positiven Ergebnis geführt hat, erneut untersucht werden.

9.2 Erstellen von Standardkurven

Die C_q-Werte aller Verdünnungsreihen für die Standardkurven (Prozesskontrollvirus-RNS, Ziel-dsDNS) werden auf Messpunkte überprüft, die außerhalb der Standardkurve mit der besten Übereinstimmung liegen. Diese C_q-Werte dürfen nicht in die Berechnungen der Standardkurve miteinbezogen werden. Je Verdünnungsreihe dürfen maximal zwei solche außerhalb der Standardkurve liegenden C_q-Werte entfernt werden und es müssen Werte aus mindestens drei (Prozesskontrollvirus-RNS) oder vier Verdünnungsstufen (dsDNS) miteinbezogen werden.

Die restlichen C_q-Werte jeder Verdünnungsreihe werden für die Erstellung der Standardkurve der jeweiligen Kontrolle verwendet. Hierzu werden die ermittelten C_q-Werte mit der $\log_{10}$-Konzentration (z. B. $\log_{10}$ Kopien pro Mikroliter Ziel-dsDNS) verglichen, um r^2 (wobei r der Pearsonsche Korrelationskoeffizient ist) sowie Steigung- und Achsennabschnittparameter zu bestimmen. Die C_q-Werte aus Doppelansätzen dürfen vor Erstellung der Kurve nicht gemittelt werden.

Standardkurven mit einem r^2-Wert von < 0,98 oder einer Steigung, die nicht zwischen -3,10 und -3,60 liegt (entsprechend einer Amplifikationseffizienz von ~90-110 %), dürfen nicht verwendet werden.

9.3 Berechnung der RT-PCR-Inhibition

In diesem Teil von ISO 15216 dient die RT-PCR-Inhibition lediglich als Parameter zur Qualitätssicherung und nicht zur Berichtigung der Ergebnisse.

Zur Abschätzung der RT-PCR-Inhibition wird der C_q-Wert der Probe „unverdünnte Proben-RNS + EC-RNS“ mit dem C_q-Wert der Probe „Wasser + EC-RNS“ sowie der Steigung der dsDNS-Standardkurve wie folgt in Bezug gesetzt:

$$\text{RT-PCR-Inhibition} = (1-10^{(\Delta Cq/\text{Steigung})}) \times 100\ \%$$

Dabei ist ΔC_q = C_q-Wert [Proben-RNS + EC-RNS] - C_q-Wert [Wasser + EC-RNS]

Wenn die RT-PCR-Inhibition ≤75 % ist, müssen die Ergebnisse der unverdünnten RNS für diese Probe verwendet werden. Ist die RT-PCR-Inhibition >75 %, so wird die Berechnung mit den C_q-Werten der Probe „Verdünnung der Proben-RNS von 10^{-1} + EC-RNS“ wiederholt.

Wenn die RT-PCR-Inhibition bei Verwendung der Verdünnung der Proben-RNS von 10^{-1} ≤75 % ist, müssen die Ergebnisse der Verdünnung der Proben-RNS von 10^{-1} für diese Probe verwendet werden. Wenn die RT-PCR-Inhibition sowohl bei der unverdünnten Proben-RNS als auch bei der Verdünnung der Proben-RNS von 10^{-1} >75 % ist, sind die Ergebnisse nicht gültig und die Probe ist erneut zu untersuchen.

Eine Untersuchungsprobe, bei der die Probe „Proben-RNS + EC-RNS“ den gleichen C_q-Wert aufweist wie die Probe „Wasser + EC-RNS“, hat eine RT-PCR-Inhibition von 0 %. Wenn der C_q-Wert der Probe „Proben-RNS + EC-RNS“ um ≤2,00 größer ist als der C_q Wert der Probe „Wasser + EC-RNS“ (vorausgesetzt, die dsDNS-Standardkurve weist eine idealisierte Steigung von −3,32 auf), so ist die RT-PCR-Inhibition ≤75 % und deshalb akzeptierbar. Wenn der C_q-Wert der Probe „Proben-RNS + EC-RNS“ um >2,00 größer ist als der C_q-Wert der Probe „Wasser + EC-RNS“, so ist die RT-PCR-Inhibition >75 % und deshalb nicht akzeptierbar.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

ANMERKUNG 1 Eine Probe, die eine nicht akzeptierbare RT-PCR-Inhibition aufweist, jedoch zu einem deutlich positiven Ergebnis führt, kann gegebenenfalls als positiv angegeben werden, wie in Abschnitt 10 beschrieben.

ANMERKUNG 2 Wenn alternative Verfahren zur Bestimmung der RT-PCR-Inhibition verwendet werden, muss die Vorgehensweise so angepasst werden, dass die gleiche Stringenz erreicht wird.

9.4 Berechnung der Extraktionseffizienz

In diesem Teil von ISO 15216 dient die Extraktionseffizienz lediglich als Parameter zur Qualitätssicherung und nicht zur Berichtigung der Ergebnisse.

Zur Abschätzung der Wiederfindung des Prozesskontrollvirus wird der C_q-Wert für die Prozesskontrolle mit der Proben-RNS (in Abhängigkeit der Ergebnisse der RT-PCR-Inhibition (9.3) unverdünnt oder in einer Verdünnung von 10^{-1}) verwendet und wie folgt in Bezug zur Standardkurve der Prozesskontrollvirus-RNS gesetzt (wenn die Ergebnisse der Verdünnung der Proben-RNS von 10^{-1} verwendet werden, wird zur Korrektur des Verdünnungsfaktors mit 10 multipliziert):

Wiederfindung des Prozesskontrollvirus = $10^{(\Delta Cq/Steigung)}$ x 100%

Dabei ist ΔC_q = C_q-Wert [Proben-RNS] – C_q-Wert [unverdünnte Prozesskontrollvirus-RNS]

Bei BMS-Proben wird die Extraktionseffizienz berechnet, indem die Wiederfindungsrate durch 0,5 dividiert und mit dem gemessenen Gesamtvolumen des Überstands (8.2.6) multipliziert wird.

Bei allen anderen Probenmatrices entspricht die Extraktionseffizienz der Wiederfindung des Prozesskontrollvirus.

Bei einer Extraktionseffizienz von <1 % sind die Ergebnisse für die Probe nicht gültig und die Probe ist erneut zu untersuchen.

Eine Probe, die denselben C_q-Wert aufweist wie unverdünnte Prozesskontrollvirus-RNS, hat eine Prozesskontrollvirus-Wiederfindung (vergleichbar mit der Extraktionseffizienz bei anderen Matrices als BMS) von 100 %. Für eine Prozesskontrollvirus-Standardkurve mit einer idealisierten Steigung von –3,32 gilt, wenn der C_q-Wert der Probe „unverdünnte Proben-RNS“ um ≤6,64 größer ist als der C_q-Wert der Probe „unverdünnte Prozesskontrollvirus-RNS“, dass die Prozesskontrollvirus-Wiederfindung >1% beträgt und deshalb akzeptierbar ist.

Bei bestimmten Sorten Weichobst, Salat oder BMS, für die keine offiziellen Validierungsdaten vorliegen, können nach angemessener Auswertung alternative Schwellenwerte für die Extraktionseffizienz verwendet werden.

ANMERKUNG 1 Eine Probe, die eine nicht akzeptierbare Extraktionseffizienz aufweist, jedoch zu einem deutlich positiven Ergebnis führt, kann gegebenenfalls als positiv angegeben werden, wie in Abschnitt 10 beschrieben.

9.5 Quantifizierung

Zur Berechnung der Konzentrationen des Zielmoleküls (in nachweisbaren Virusgenomkopien je Mikroliter RNS) werden für jedes Zielvirus die C_q-Werte der Vertiefungen herangezogen, die Proben-DNS ohne EC-RNS (in Abhängigkeit von den Ergebnissen zur Amplifikationseffizienz, 9.3, unverdünnt oder in einer Verdünnung von 10^{-1}) enthalten. Die Konzentration wird für jedes Replikat anhand der dsDNS-Standardkurve wie folgt berechnet:

Konzentration = $10^{(\Delta Cq/Steigung)}$

Dabei ist ΔC_q = C_q-Wert[Proben-RNS] – Achsenabschnitt der Standardkurve

Negativen Replikaten sind Konzentrationen von Null Kopien pro Mikroliter RNS zuzuordnen. Für jede Probe wird der Mittelwert aus den Konzentrationen der beiden Replikate berechnet.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Bei nicht-BMS-Proben wird dieser Wert mit 100 (bei unverdünnter RNS) oder 1 000 (bei Verdünnung der RNS von 10^{-1}) multipliziert, um die Anzahl der nachweisbaren Virusgenomkopien in der gesamten Probe zu berechnen.

Bei BMS-Proben wird dieser Wert mit 200 (bei unverdünnter DNS) oder 2 000 (bei Verdünnung der RNS von 10^{-1}) und anschließend mit dem Gesamtvolumen des Überstands (8.2.6) multipliziert, um die Anzahl der nachweisbaren Virusgenomkopien in der gesamten Probe zu berechnen.

Um die geschätzte Menge des Zielvirus in nachweisbaren Virusgenomkopien je Milliliter, Gramm oder Quadratzentimeter zu erhalten, wird die Anzahl der Genomkopien der gesamten Probe durch das Ausgangsvolumen (in Flaschen abgefülltes Trinkwasser), die Ausgangsmenge (BMS, Weichobst, Salate) oder die Ausgangsfläche (feste Oberflächen) der Probe dividiert.

10 Angabe der Ergebnisse

Positive Ergebnisse für jedes Zielvirus sind als „*x* nachweisbare Virusgenomkopien je Milliliter“, „*x* nachweisbare Virusgenomkopien je Gramm“ oder „*x* nachweisbare Virusgenomkopien je Quadratzentimeter“ anzugeben, wobei *x* der berechneten Menge für die jeweilige Probe entspricht, vorausgesetzt, die Menge liegt oberhalb der Bestimmungsgrenze (LOQ) des Verfahrens.

Wird die Zielvirus-RNS in einer Menge < LOQ nachgewiesen, so müssen die Ergebnisse als „Virusgenom nachgewiesen in einer Menge unterhalb der Bestimmungsgrenze“ gefolgt von („*y* nachweisbare Virusgenomkopien je Milliliter“, „*y* nachweisbare Virusgenomkopien je Gramm“ oder „*y* nachweisbare Virusgenomkopien je Quadratzentimeter“) angegeben werden, wobei *y* die LOQ des Verfahrens ist.

Wird das Zielvirus nicht nachgewiesen, sind die Ergebnisse als „nicht nachgewiesen“ gefolgt von („<*z* nachweisbare Virusgenomkopien je Milliliter“, „<*z* nachweisbare Virusgenomkopien je Gramm“ oder „<*z* nachweisbare Virusgenomkopien je Quadratzentimeter“) anzugeben, wobei *z* die Nachweisgrenze des Verfahrens (LOD) ist.

Wird kein gültiges Ergebnis erhalten, müssen die Ergebnisse normalerweise als „kein Ergebnis“ angegeben werden. Wenn jedoch bei einer Probe mit einer nicht akzeptierbaren Amplifikations- oder Extraktionseffizienz ein ansonsten gültiges positives Ergebnis erhalten wird, dürfen die Ergebnisse gegebenenfalls als „Virusgenom nachgewiesen in“ gefolgt von „*b* ml;“, „*b* g;“ oder „*b* cm^2;“ und „nicht quantitativ bestimmbar“ angegeben werden, wobei *b* die Menge der untersuchten Probe ist. Einzelheiten sind im Untersuchungsbericht anzuführen.

Wenn die Ergebnisse der RNS-Verdünnung von 10^{-1} verwendet werden, müssen die Werte für die LOD und LOQ angepasst und mit 10 multipliziert werden.

11 Präzision des Verfahrens

11.1 Laborübergreifende Studie

Die Ergebnisse der laborübergreifenden Studie zur Bestimmung der Präzision des Verfahrens sind in Anhang J zusammengefasst. Abweichungen vom Wiederhol- und Vergleichsstandard sowie Grenzwerte für HAV, Norovirus GI und Norovirus GII wurden mithilfe von sieben Arten von in unterschiedlichem Grad kontaminierten Lebensmitteln bestimmt. Die in der laborübergreifenden Studie gesammelten Daten gelten unter Umständen nur für die Konzentrationsbereiche und Lebensmittel, die in Anhang J angegeben sind.

11.2 Wiederholpräzision

Die absolute Differenz zwischen zwei unabhängigen, mithilfe des gleichen Verfahrens am identischen Probenmaterial im selben Labor vom selben Bediener mit denselben Geräten innerhalb des kürzest möglichen Zeitintervalls erhaltenen einzelnen (log_{10}-transformierten) Untersuchungsergebnissen (Anzahl nachweisbarer Virusgenomkopien je Quadratzentimeter, je Gramm oder je Milliliter) oder das Verhältnis zwischen dem höheren und dem niedrigeren der beiden Untersuchungsergebnisse auf der Normalskala darf in nicht mehr als 5 % der Fälle die Wiederholgrenze *r* überschreiten.

AVA Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Als allgemeine Angabe der Wiederholgrenze (*r*) dürfen bei Untersuchungen von Lebensmittelproben im Allgemeinen die folgenden Werte verwendet werden:

r = 0,60 (angegeben als Differenz zwischen $\log_{10}$-transformierten Untersuchungsergebnissen; Bereich für unterschiedliche Matrices, Zielviren und Kontaminationsgrade 0,24-1,89), oder

r = 3,98 (angegeben als Verhältnis zwischen Untersuchungsergebnissen).

BEISPIEL In einem Labor wurde als erstes Untersuchungsergebnis eine Anzahl von 10 000 oder $1,0 \times 10^4$ nachweisbaren Virusgenomkopien je Gramm Lebensmittel erhalten. Unter Wiederholbedingungen sollte das Verhältnis zwischen dem ersten Untersuchungsergebnis und einem zweiten Untersuchungsergebnis nicht größer als 3,98 sein. Somit sollte das zweite Ergebnis zwischen 2 513 (10 000/3,98) und 39 800 (10 000 x 3,98) nachweisbaren Virusgenomkopien je Gramm liegen.

11.3 Vergleichgrenze

Die absolute Differenz zwischen zwei mithilfe des gleichen Verfahrens am identischen Probenmaterial in unterschiedlichen Laboratorien von unterschiedlichen Bedienern mit unterschiedlichen Geräten erhaltenen einzelnen ($\log_{10}$-transformierten) Untersuchungsergebnissen (Anzahl nachweisbarer Virusgenomkopien je Quadratzentimeter, je Gramm oder je Milliliter) oder das Verhältnis zwischen dem höheren und dem niedrigeren der beiden Untersuchungsergebnisse auf der Normalskala darf in nicht mehr als 5 % der Fälle die Vergleichgrenze *R* überschreiten.

Als allgemeine Angabe der Vergleichgrenze (*R*) dürfen bei Untersuchungen von Lebensmittelproben im Allgemeinen die folgenden Werte verwendet werden:

R = 1,35 (angegeben als Differenz zwischen $\log_{10}$-transformierten Untersuchungsergebnissen, Bereich 0,65-2,04), oder

R = 22,39 (angegeben als Verhältnis zwischen Untersuchungsergebnissen).

BEISPIEL A In einem Labor wurde als Untersuchungsergebnis eine Anzahl von 10 000 oder $1,0 \times 10^4$ nachweisbaren Virusgenomkopien je Gramm Lebensmittel erhalten. Unter Vergleichsbedingungen sollte das Verhältnis zwischen dem Untersuchungsergebnis aus dem ersten Labor und dem Untersuchungsergebnis aus einem zweiten Labor nicht größer als 24,40 sein. Das Ergebnis aus dem zweiten Labor sollte also zwischen 447 (10 000/22,39) und 223 900 (10 000 x 22,39) cfu je Gramm liegen.

12 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens folgende Angaben enthalten:

a) sämtliche Informationen, die für die vollständige Identifizierung der Probe notwendig sind;

b) das angewendete Probenahmeverfahren, sofern bekannt;

c) das verwendete Untersuchungsverfahren mit Verweisung auf den vorliegenden Teil von ISO 15216;

d) alle in diesem Teil von ISO 15216 nicht festgelegten oder als optional angesehenen Einzelheiten des Verfahrensablaufs, einschließlich aller Vorkommnisse, die das (die) Untersuchungsergebnis(se) beeinflusst haben können;

e) die LOD (3.15) und LOQ (3.16) des Verfahrens (gegebenenfalls angepasst, um eine Verdünnung der RNS von 10^{-1} zu berücksichtigen) und die Matrix, in der sie ermittelt wurden;

f) die Extraktionseffizienz der Probe (9.4);

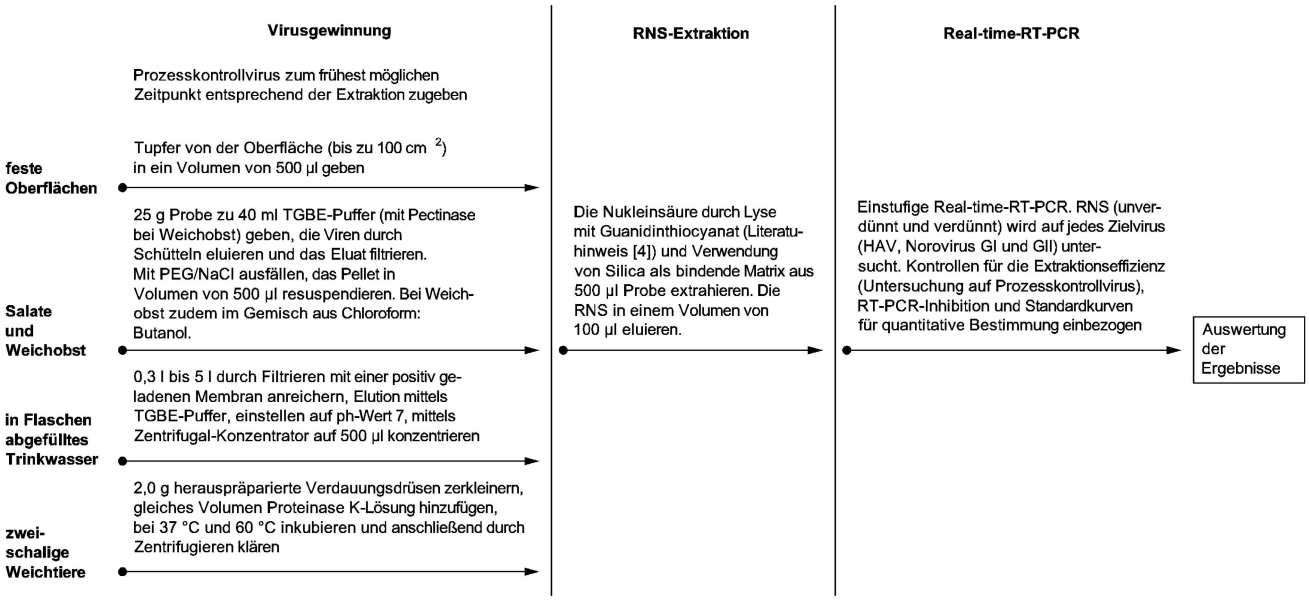
g) das (die) erhaltene(n) Untersuchungsergebnis(se), angegeben nach Abschnitt 10.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Anhang A
(normativ)

Schematische Darstellung des Verfahrens



Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Anhang B
(informativ)

Real-time RT-PCR-Mastermixe und Parameter für die Durchführung der PCR

Zu den Real-time RT-PCR-Mastermixen unter Anwendung des Ultrasense™ 1) qRT-PCR-Systems von Invitrogen siehe Tabelle B.1 und zu den Parametern für die Durchführung der PCR siehe Tabelle B.2.

Tabelle B.1 — Mastermix

Reagenzien	**Endkonzentration** (in 25 µl)	Volumen je Reaktion (µl)
5× Ultrasense Reaktionsmix	1-fach konzentriert	**5 ± 0,1**
FW-Primer	0,5 pmol/µl	**nach Bedarf**
REV-Primer	0,9 pmol/µl	**nach Bedarf**
Sonde	0,25 pmol/µl	**nach Bedarf**
Referenzfarbstoff ROX (50-fach konzentriert)	nach Bedarf[a]	**nach Bedarf**
RNS-Ultrasense-Enzymmix	—	**1,25 ± 0,05**
Wasser (5.2.1)	—	**nach Bedarf**
Gesamtvolumen	—	**20 ± 0,2**

[a] Bei Real-time-Geräten von Applied Biosystems muss ROX einfach konzentriert verwendet werden; bei Stratagene MX3000 kann ROX entweder 0,1-fach konzentriert verwendet oder weggelassen werden. Bei anderen Geräten sind die Anweisungen des Herstellers hinzuzuziehen.

Real-time-Geräte von Applied Biosystems und Stratagene MX3000 sind handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch ISO.

Tabelle B.2 — Parameter für die Durchführung der PCR

Schrittbeschreibung		**Temperatur und Zeitdauer**	Anzahl der Zyklen
RT		55 °C für 1 h	**1**
Vorwärmen		95 °C für 5 min	**1**
Amplifikation	Denaturierung	95 °C für 15 s	**45**
	Annealing-Elongation	60 °C für 1 min	
		65 °C für 1 min	

1) Invitrogen RNA Ultrasense™ ist die Herstellerbezeichnung eines Produktes, geliefert von Invitrogen. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar den Anforderungen des Verfahrens entsprechen.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Anhang C
(informativ)

Real-time RT-PCR-Primer und -Hydrolysesonden für den Nachweis von HAV, Norovirus GI und GII sowie Mengo-Virus (Prozesskontrolle)

C.1 HAV

HAV68 (FW)	TCA CCG CCG TTT GCC TAG	Literaturhinweis [5]
HAV240 (REV):	GGA GAG CCC TGG AAG AAA G	Literaturhinweis [5]
HAV150(-) (SONDE):	CCT GAA CCT GCA GGA ATT AA	Literaturhinweis [5]

Sonde markiert: am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM), am 3'-Ende mit MGBNFQ (in der kleinen Furche bindender/nicht fluoreszierender Quencher)

Dieses Primerset amplifiziert ein Produkt von variabler Länge (157-188 bp) je nach Virusstamm; beispielsweise ein Produkt von 174 bp entsprechend den Nukleotiden 68-241 des HAV-Stamms HM175 (GenBank accession number M14707).

Der Sequenzabgleich unter Verwendung aller in GenBank verfügbaren Sequenzen der Zielsequenz zeigt auf, dass dieses Primer- und Sondensystem für die quantitative Bestimmung aller HAV-Genotypen geeignet ist. Zudem deutet die Quasispezies-Analyse des Mutanten-Spektrums darauf hin, dass dieser Genort nicht zur Variabilität neigt und demzufolge das Nachweissystem eine Langzeitrobustheit aufweist. Die Spezifität der Primer wurde mit 10 verschiedenen Picornaviren verifiziert: Poliovirus (Serotyp 1, Impfstamm), humanes Enterovirus B (Echovirus 1), humanes Enterovirus B (Echovirus 11), humanes Enterovirus B (Echovirus 30), humanes Enterovirus B (Coxsackievirus B5), humanes Enterovirus C (Coxsackievirus A24), humanes Enterovirus D (Enterovirus 70), bovines Enterovirus, porzines Teschovirus (porzines Enterovirus 1) und Enzephalomyokarditis-Virus. Zudem wurden weitere Enteroviren, wie z. B. Hepatitis E-Virus, humanes und porzines Rotavirus (Gruppe A), Norovirus, Mamastrovirus (humanes Astrovirus Typ 1) und humanes Adenovirus F (enterisches Adenovirus Typ 40) getestet. Keines der untersuchten Viren führte zu einem positiven Ergebnis, weder bei Einsatz von hohen Konzentrationen (10^6 bis 10^8 TCID50/ml oder unverdünnte 0,1 g/ml Kotsuspensionen) noch bei geringen Konzentrationen (10^4 TCID50/ml oder Verdünnungen von 0,1 g/ml Kotsuspensionen von 10^{-1}). Die LOD des Nachweissystems beträgt 10 ssRNS-Moleküle, 1 virales RNS-Molekül und 0,05 infektiöse Viren je Reaktion (Literaturhinweis [5]).

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

C.2 Norovirus GI

QNIF4 (FW):	CGC TGG ATG CGN TTC CAT	Literaturhinweis [6]
NV1LCR (REV):	CCT TAG ACG CCA TCA TCA TTT AC	Literaturhinweis [7]

Bei der Erstellung und Validierung dieses Teils von ISO 15216 wurden zwei verschiedene Sonden für das Norovirus GI verwendet. Beide können mit den hier angegebenen FW- und REV-Primern verwendet werden.

NVGG1p (SONDE):	TGG ACA GGA GAY CGC RAT CT	Literaturhinweis [7]

Sonde markiert: am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM), am 3'-Ende mit 6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)

TM9 (SONDE):	TGG ACA GGA GAT CGC	Literaturhinweis [8]

Sonde markiert: am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM), am 3'-Ende mit MGBNFQ (in der kleinen Furche bindender/nicht fluoreszierender Quencher)

Dieses Primerset amplifiziert ein Produkt von 89 bp entsprechend den Nukleotiden 5291-5376 des Norwalk-Virus (GenBank accession number M87661).

C.3 Norovirus GII

QNIF2 (FW):	ATG TTC AGR TGG ATG AGR TTC TCW GA	Literaturhinweis [9]
COG2R (REV):	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	Literaturhinweis [10]
QNIFs (SONDE):	AGC ACG TGG GAG GGC GAT CG	Literaturhinweis [9]

Sonde markiert: am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM), am 3'-Ende mit 6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)

Dieses Primerset amplifiziert ein Produkt von 89 bp entsprechend den Nukleotiden 5012-5100 des Lordsdale-Virus (GenBank accession number X86557).

Der für den Nachweis von Noroviren ausgewählte Bereich umfasst die sehr konservierte Region am 5'-Ende von ORF2 (Literaturhinweis [10]). Sequenzabgleiche des Nachweissystems mit sämtlichen in GenBank verfügbaren Sequenzen der Zielregion zeigen auf, dass die Primer- und Sondensysteme für die quantitative Bestimmung aller GI bzw. GII NoV geeignet sind. Außerdem wurden die Verwendbarkeit und Sensitivität der Primer und Sonden mit 18 NoV-Referenzstämmen verifiziert: GI.1 (Norwalk-Virus); GI.2 (Whiterose); GI.3 (Southampton); GI.4 (Malta); GI.5 (Musgrove); GI.6 (Mikkeli); GI.7 (Winchester); GI.10 (Boxer); GII.1 (Hawaii); GII.2 (Melksham); GII.3 (Toronto); GII.4 (Grimsby); GII.6 (Seacroft); GII.7 (Leeds); GII.10 (Erfurt); GIIb-Varianten; GIIc-Varianten und GIV (Alphatron).

Die Spezifität der Primer wurde mit sechs verschiedenen humanen Enteroviren überprüft: Poliovirus (Serotyp 1, Impfstamm), Hepatitis A-Virus, Hepatitis E-Virus, Aichi-Virus, Astrovirus und Rotavirus. Die Spezifität wurde außerdem an sieben Bakterien getestet, die in BMS nachgewiesen werden können: *Escherichia coli, Shewenella putrefaciens, Chromobacterium violaceum, Aeromonas sobria, Vibrio alginolyticus*, *Vibrio paraheamolyticus* und *Vibrio cholerae)*. Keines der untersuchten Viren oder Bakterien führte zu einem positiven Ergebnis. Die LOD der Nachweissysteme liegt zwischen 1 viralen und 10 viralen RNS-Molekül(en) (in Abhängigkeit des NoV-Stammes) (Literaturhinweise [9][11]).

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

C.4 Mengo-Virus

Mengo 110 (FW):	GCG GGT CCT GCC GAA AGT	Literaturhinweis [12]
Mengo 209 (REV):	GAA GTA ACA TAT AGA CAG ACG CAC AC	Literaturhinweis [12]
Mengo 147 (SONDE):	ATC ACA TTA CTG GCC GAA GC	Literaturhinweis [12]

Sonde markiert: am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM), am 3'-Ende mit MGBNFQ (in der kleinen Furche bindender/nicht fluoreszierender Quencher)

Dieses Primerset amplifiziert ein Produkt von 100 bp entsprechend den Nukleotiden 110-209 des deletanten Mengo Virus-Stammes MC_0, welcher bei Erarbeitung dieses Teils von ISO 15216 verwendet wurde. Dieses entspricht den Nukleotiden 110-270 des nicht deletanten Mengo-Virus Isolates M (GenBank accession number L22089).

Der für die quantitative Bestimmung des Mengo-Virus gewählte Zielbereich ist dem des HAV in Bezug auf Struktur, Länge und Basenzusammensetzung so ähnlich wie möglich (Literaturhinweis [5]). Die Primersequenzen passen zu keiner anderen in GenBank zur Verfügung stehenden Sequenz.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Anhang D
(informativ)

Vermehrung des Mengovirus-Stammes MC_0 zur Verwendung als Prozesskontrolle

D.1 Allgemeines

Das Mengovirus ist ein murines Virus aus der Familie der *Picornaviridae*. Der Mengovirus-Stamm MC_0 (ATCC® VR-1597™)[2)] ist ein rekombinantes Virus (Deletionsmutante), dem im Vergleich zum Wildtyp-Mengovirus der Poly(C)-Abschnitt fehlt. Es hat identische Wachstumseigenschaften wie das Wildtyp-Virus, verfügt jedoch über einen avirulenten Phänotyp (Literaturhinweis [13]). Dieser Stamm wurde bereits als Prozesskontrollvirus bei Nachweisverfahren für HAV und Noroviren verwendet (Literaturhinweise [5],[11]) und bei der Erarbeitung dieses Teils von ISO 15216 als Prozesskontrolle eingesetzt.

Der Mengovirus-Stamm MC_0 ist ein gentechnisch veränderter Organismus (GVO). Bei Laboratorien, in denen die Verwendung eines GVO verboten oder problematisch ist, muss eine andere Prozesskontrolle verwendet werden.

D.2 Reagenzien und Geräte

D.2.1 Empfohlenes Zellkulturmedium für HeLa-Zellen ist Eagle's Minimalmedium mit 2 mmol/l L-Glutamin und Earle's BSS (gepufferte Salzlösung), angereichert mit 1,5 g/l Natriumhydrogencarbonat, 0,1 mmol/l nichtessenzielle Aminosäuren, 1,0 mmol/l Natriumpyruvat, einfach konzentrierter Streptomycin/Penicillin-Lösung, 100 ml/l (Wachstumsmedium) oder 20 ml/l (Erhaltungsmedium) fötales Rinderserum.

D.2.2 Für die Zellkultur und die Vermehrung von Viren ist eine spezielle Ausstattung, inklusive Brutschrank (Brutschränke) mit einstellbarer CO_2-Konzentration und Verbrauchsmaterialien für Zellkulturen (Kolben usw.) erforderlich.

D.3 Durchführung

Das Mengovirus wird in einer (50 ± 10) ml/l CO_2-Atmosphäre (bei offenen Gefäßen) oder einer nicht eingestellten CO_2-Atmosphäre (geschlossene Gefäße) auf einem bis zu 80 % bis 90 % konfluenten einschichtigen Zellrasen von HeLa-Zellen (ATCC® CCL-2™)[2)] vermehrt, bis ein zytopathogener Effekt von mindestens 75 % erreicht ist.

Das Zellkulturgefäß wird einem einzelnen Gefrier-Auftau-Zyklus unterzogen. Anschließend wird der Inhalt (10 ± 1) min bei 3 000 × *g* zentrifugiert.

Der (Zellkultur-)Überstand wird für die Herstellung des Virusmaterials für die Prozesskontrolle (5.3.9) zurückgestellt.

---

2) ATCC® VR-1597™ und ATCC® CCL-2™ sind die Herstellerbezeichnungen von Produkten, geliefert von American Type Culture Collection. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar den Anforderungen des Verfahrens entsprechen.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Anhang E
(informativ)

RNS-Extraktion unter Anwendung des BioMerieux NucliSens®[3]-Systems

E.1 Reagenzien

E.1.1 BioMerieuxNucliSens®-Lysispuffer.

E.1.2 Magnetische Extraktionsreagenzien von BioMerieuxNucliSens® (bestehend aus einer magnetischen Silica-Lösung, Waschpuffer 1, 2 und 3 und Elutionspuffer).

E.2 Geräte

E.2.1 BioMerieuxNucliSens®miniMAG oder **easyMAG**.

E.2.2 Magnetständer von BioMerieuxNucliSens®.

E.2.3 Thermoschüttler oder ein gleichwertiges Gerät zum Schütteln von 1,5-ml-Röhrchen bei (60 ± 2) °C und etwa 1 400 min^{-1}.

E.2.4 Röhrchen mit Schraubverschluss, mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml, geeignet für die Verwendung mit einem NucliSens®-Gerät.

E.3 Durchführung

(2 ± 0,1) ml des NucliSens®-Lysispuffers werden in ein Röhrchen gegeben. (500 ± 10) µl der Probe (BMS) oder die gesamte Probe (andere Matrices) werden/wird hinzugefügt. Der Inhalt wird kurz auf einem Vortex-Mischer gemischt.

Es wird (10 ± 1) min bei Raumtemperatur inkubiert.

(50 ± 2) µl der gut gemischten magnetischen Silica-Lösung werden in das Röhrchen gegeben. Der Inhalt wird kurz auf einem Vortex-Mischer gemischt.

Es wird (10 ± 1) min bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Röhrchen wird (120 ± 10) s bei 1 500 × g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand vorsichtig verworfen, zum Beispiel durch Absaugen.

(400 ± 10) µl Waschpuffer 1 werden hinzugefügt und das Pellet wird durch Pipettieren oder Mischen mit einem Vortex-Mischer resuspendiert.

Die Suspension wird in ein 1,5-ml-Röhrchen mit Schraubverschluss überführt. Es wird unter Verwendung des automatischen Extraktionssystems von miniMAG oder easyMAG (30 ± 2) s gewaschen Nach dem Waschen wird die Silica unter Anwendung des Magneten des Extraktionssystems von miniMAG oder easyMAG sedimentiert. Der Überstand wird verworfen, zum Beispiel durch Absaugen.

---

[3] BioMerieux NucliSens® ist die Herstellerbezeichnung eines Produktes, geliefert von BioMerieux. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Die Röhrchen werden vom Magneten getrennt. Danach werden (400 ± 10) µl Waschpuffer 1 hinzugefügt. Das Pellet wird resuspendiert und (30 ± 2) s gewaschen. Die Silica wird unter Anwendung des Magneten sedimentiert. Der Überstand wird verworfen.

Die Röhrchen werden vom Magneten getrennt. Danach werden (500 ± 10) µl Waschpuffer 2 hinzugefügt. Das Pellet wird resuspendiert und (30 ± 2) s gewaschen. Die Silica wird unter Anwendung des Magneten sedimentiert. Der Überstand wird verworfen. Der Vorgang wird wiederholt.

Die Röhrchen werden vom Magneten getrennt. Danach werden (500 ± 10) µl Waschpuffer 3 hinzugefügt (die Proben dürfen nicht länger als notwendig im Waschpuffer 3 belassen werden). Es wird (15 ± 1) s gewaschen. Die Silica wird unter Anwendung des Magneten sedimentiert. Der Überstand wird verworfen.

(100 ± 2) µl Elutionspuffer werden hinzugefügt. Die Röhrchen werden verschlossen, in einen Thermoschüttler oder ein gleichwertiges Gerät überführt und (5,0 ± 0,5) min bei (60 ± 1) °C unter Schütteln bei konstanten Wippbewegungen bei etwa 1 400 min^{-1} inkubiert.

Die Röhrchen werden in einen Magnetständer gestellt und die Silica wird sedimentiert. Anschließend wird das Eluat in ein neues Röhrchen überführt.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09

Anhang F
(normativ)

Zusammensetzung und Herstellung von Reagenzien und Pufferlösungen

F.1 5-fach konzentrierte PEG/NaCl-Lösung (500 g/l PEG 8 000, 1,5 mol/l NaCl)

F.1.1 Zusammensetzung

Polyethylen (PEG) 8 000	(500 ± 2) g
NaCl	(87 ± 1) g
Wasser (5.2.1)	nach Bedarf

F.1.2 Herstellung

Die Feststoffe werden in (450 ± 5) ml Wasser (5.2.1) gelöst, bei Bedarf unter vorsichtigem Erwärmen. Das Volumen wird mit Wasser auf (1 000 ± 10) ml aufgefüllt und alles wird gut gemischt. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

F.2 Chloroform/Butanol-Gemisch

F.2.1 Zusammensetzung

Chloroform	(10 ± 0,1) ml
Butanol	(10 ± 0,1) ml

F.2.2 Herstellung

Die Bestandteile werden vermischt.

F.3 Proteinase K-Lösung

F.3.1 Zusammensetzung

Proteinase K (30 U/mg)	(20 ± 0,1) mg
Wasser (5.2.1)	(200 ± 2) ml

F.3.2 Herstellung

Die Proteinase K wird in Wasser gelöst. Alles wird gründlich gemischt.

Die Lösung wird in Arbeitsvolumina bei (−20 ± 5) °C für höchstens 6 Monate aufbewahrt. Einmal aufgetaut, ist die Lösung bei (4 ± 2) °C aufzubewahren und innerhalb einer Woche zu verbrauchen.

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 15216-1:2015-09