

DIN EN ISO 15216-2

ICS 07.100.30

Entwurf

Einsprüche bis 2018-06-27
 Vorgesehen als Ersatz für
 DIN CEN ISO/TS 15216-2
 (DIN SPEC 10051-2):2014-09

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
 Horizontales Verfahren zur Bestimmung von Hepatitis A-Virus und
 Norovirus in Lebensmitteln mittels Real-time-RT-PCR –
 Teil 2: Nachweisverfahren (ISO/DIS 15216-2:2018);
 Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 15216-2:2018**

Microbiology of the food chain –
 Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using
 real-time RT-PCR –

Part 2: Method for detection (ISO/DIS 15216-2:2018);
 German and English version prEN ISO 15216-2:2018

Microbiologie des aliments –
 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 2: Méthode de détection (ISO/DIS 15216-2:2018);
 Version allemande et anglaise prEN ISO 15216-2:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-04-27 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
 Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-
 Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de,
 sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im
 Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-
 Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL),
 10772 Berlin, 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 105 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 15216-2:2018) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Arbeitskreis NA 057-01-06-20 AK „Viren“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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

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

ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 17468	siehe DIN EN ISO 17468
ISO 20238	siehe DIN EN ISO 20238
ISO 22119	siehe DIN ISO/TS 22119
ISO 22174	siehe DIN EN ISO 22174

Änderungen

Gegenüber DIN CEN ISO/TS 15216-2 (DIN SPEC 10051-2):2014-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

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

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 20238, *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*

— Leerseite —

Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zur Bestimmung von Hepatitis A-Virus und Norovirus in Lebensmitteln mittels Real-time-RT-PCR — Teil 2: Nachweisverfahren (ISO/DIS 15216-2:2018)

Microbiologie des aliments — 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 2: Méthode de détection (ISO/DIS 15216-2:2018)

Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR — Part 2: Method for detection (ISO/DIS 15216-2:2018)

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	9
4.1 Virusgewinnung	9
4.2 RNA-Extraktion	10
4.3 Real-time-RT-PCR (Real-time-Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion)	10
4.4 Kontrollmaterialien	10
4.5 Untersuchungsergebnisse	11
5 Reagenzien	11
5.1 Allgemeines	11
5.2 Reagenzien, die im Lieferzustand verwendet werden	11
5.3 Herzustellende Reagenzien	12
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien	13
7 Probenahme	15
8 Durchführung	15
8.1 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien	15
8.2 Virusgewinnung	15
8.3 RNA-Extraktion	18
8.4 Real-time-RT-PCR	18
9 Auswertung der Ergebnisse	21
9.1 Allgemeines	21
9.2 Erstellen der Standardkurve für die Prozesskontrollvirus-RNA	21
9.3 Kontrolle auf Inhibition der RT-PCR	22
9.4 Berechnung der Extraktionseffizienz	22
10 Angabe der Ergebnisse	23
11 Leistungsmerkmale des Verfahrens	23
11.1 Validierungsstudie	23
11.2 Empfindlichkeit	24
11.3 Spezifität	24
11.4 LOD ₅₀	24
12 Untersuchungsbericht	24
Anhang A (normativ) Schematische Darstellung des Verfahrens	25
Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung von Reagenzien und Pufferlösungen	26
Anhang C (informativ) Real-time-RT-PCR-Mastermixe und Parameter für die Durchführung der PCR	29

Anhang D (informativ) Real-time-RT-PCR-Primer und -Hydrolysesonden für den Nachweis von HAV, Norovirus GI und GII sowie Mengovirus (Prozesskontrolle).....	30
Anhang E (informativ) Vermehrung des Mengovirus-Stamms MC ₀ zur Verwendung als Prozesskontrolle.....	33
Anhang F (normativ) RNA-Extraktion unter Anwendung des BioMerieux NucliSens®-Systems.....	34
Anhang G (informativ) Herstellung von RNA-Stammlösungen für die Verwendung als externe Kontrolle (EC-RNA).....	36
Anhang H (informativ) Beispielhafte Plattenbelegung.....	39
Anhang I (informativ) Studien zur Validierung von Verfahren und Leistungsmerkmalen	40
Literaturhinweise.....	52

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 15216-2:2018) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird CEN ISO/TS 15216-2:2014 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 15216-2:2018 wurde von CEN als prEN ISO 15216-2:2018 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (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 Themen 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.

Eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

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

Diese erste Ausgabe ersetzt ISO/TS 15216-2:2013, die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- 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 Proben-RNA und Negativkontrollen;
- Hinzufügen der Leistungsmerkmale des Verfahrens und von Ergebnissen der Studien zur Methodenvvalidierung.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 15216 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Einleitung

Hepatitis-A-Viren (HAV) und Noroviren sind wichtige Erreger von lebensmittelbedingten Virus-erkrankungen beim Menschen. Bislang gibt es keine Routineverfahren zur Kultivierung von Noroviren und die Kultivierungsverfahren von HAV eignen sich nicht zur Routineanwendung auf 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 eine Adsorption und Elution der Viren unter Verwendung positiv geladener Membranen und anschließender Anreicherung mittels Ultrafiltration. Bei zweischaligen Weichtieren (Muscheln, en: bivalve molluscan shellfish, BMS) werden die Viren aus dem Gewebe der Verdauungsdrüsen durch Behandlung mit einer Proteinase-K-Lösung isoliert. Bei allen Matrices, die nicht in dieser Internationalen Norm 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 Nukleinsäuren an eine Silica-Matrix beruht. Bei der Real-time-RT-PCR wird die Amplifikation während des Real-time-RT-PCR-Zyklus durch Messung der Anregung von fluoreszenzmarkierten Molekülen sichtbar gemacht. Bei der Real-time-RT-PCR mit Hydrolysesonden wird eine sequenzspezifische, mit Fluoreszenzmarkern gekoppelte Nukleotidsonde verwendet, die ebenfalls eine simultane Bestätigung der Zieltemplates ermöglicht. Diese Modifikationen erhöhen Empfindlichkeit und Spezifität des Real-time-RT-PCR-Verfahrens und erübrigen zusätzliche Schritte zur Verifizierung des Amplifikationsergebnisses nach der Real-time-RT-PCR. Aufgrund der Komplexität des Verfahrens ist es notwendig, einen umfassenden Satz von Kontrollen mitzuführen. Das in diesem Teil von ISO 15216 beschriebene Verfahren ermöglicht den Nachweis von Virus-RNA in der Untersuchungsprobe. Eine schematische Darstellung des Verfahrens wird in Anhang A gegeben.

Die im Vorwort aufgezählten wesentlichen Änderungen zu ISO/TS 15216-2:2013, die in diesem Dokument eingeführt werden, gelten als geringfügig (siehe ISO 17468 [2]).

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Verfahren für den Nachweis 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 auf Lebensmitteloberflächen fest. Nach der Freisetzung der Viren aus der Untersuchungsprobe wird die virale RNA durch Aufschluss des Viruskapsids mit Guanidinthiocyanat und Adsorption an Silica(-Partikel) extrahiert. Die Zielsequenzen in der viralen RNA werden amplifiziert und mittels Real-time-RT-PCR detektiert.

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

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 22174, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens — General requirements and definitions*

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 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*

3 Begriffe

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

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

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

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

3.1

Lebensmittel

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

Anmerkung 1 zum Begriff: Für die Anwendung dieses 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

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

BEISPIEL Kopfsalat oder Frühlingszwiebeln

3.5

Hepatitis-A-Virus

HAV

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

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

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

3.6

Norovirus

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

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

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

3.7

Nachweis des HAV

Nachweis von HAV-RNA in einer zuvor festgelegten Menge oder einem zuvor festgelegten Volumen eines Lebensmittels oder einem zuvor festgelegten Flächeninhalt einer Lebensmitteloberfläche

3.8

Nachweis des Norovirus

Nachweis von Norovirus-RNA in einer zuvor festgelegten Menge oder einem zuvor festgelegten Volumen eines Lebensmittels oder einem zuvor festgelegten Flächeninhalt einer Lebensmitteloberfläche

3.9

Prozesskontrollvirus

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

3.10

Prozesskontrollvirus-RNA

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

3.11

negative RNA-Extraktionskontrolle

Kontrolle ohne Ziel-RNA, mit der sämtliche Schritte der Nukleinsäureextraktion und des Nachweisverfahrens 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 Schritte des analytischen Prozesses durchläuft

3.13

Hydrolysesonde

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

3.14

negative Real-time-RT-PCR-Kontrolle

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

3.15

externe Kontroll-RNA

EC-RNA

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

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

3.16

C_q -Wert

Quantifizierungszyklus; 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.

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, eine matrixspezifische Virusextraktion und/oder -anreicherung durchzuführen, um ein Substrat für die nachfolgenden gemeinsamen Teile des Prozesses bereitzustellen. Die Wahl des Verfahrens hängt von der jeweiligen Matrix ab.

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 von RT-PCR-Inhibitoren zu reduzieren. In diesem Teil von ISO 15216 wird das chaotrope Reagenz Guanidinthiocyanat verwendet, um das Viruskapsid aufzuschließen. Die freigesetzte RNA wird anschließend an Silica (Siliciumdioxid) adsorbiert und durch mehrere Waschschriffe gereinigt. Die aufgereinigte virale RNA wird vor der Real-time-RT-PCR von der Silica-Matrix in eine Pufferlösung eluiert.

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

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

Bei der Real-time-RT-PCR unter Verwendung einer Hydrolysesonde wird eine kurze DNA-Sonde verwendet, an deren gegenüberliegenden Enden ein Fluoreszenzmarker und ein Fluoreszenzquencher gebunden sind. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ermöglicht, dass die Sonde hydrolysiert wird und das Fluoreszenzsignal proportional zur Menge des Amplifikationsprodukts ansteigt.

Aufgrund der oft in Lebensmitteln oder auf Lebensmitteloberflächen vorliegenden geringen Mengen an Template-Viren und der Diversität der einzelnen Zielvirusstämme ist es von Bedeutung, sowohl geeignete Reagenzien für die One-Step-Real-time-RT-PCR als auch geeignete PCR-Primer und Hydrolysesonden auszuwählen. Leitlinien für deren Auswahl sind in 5.2.18 und 5.2.19 angeführt. Erläuternde Einzelheiten zu den Reagenzien, Primern und Sonden (die bei der Erarbeitung dieses Teils von ISO 15216 verwendet wurden) sind in den Anhängen C und D angeführt.

4.4 Kontrollmaterialien

4.4.1 Prozesskontrollvirus

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

Das zur Verwendung als Prozesskontrolle ausgewählte Virus muss ein kultivierbares, nicht umhülltes, einzelsträngiges RNA-Virus in Plusstrangorientierung sein sowie eine ähnliche Größe wie die Zielviren aufweisen, um ein morphologisch und physikalisch-chemisch vergleichbares Modell darzustellen. Zusätzlich muss das Prozesskontrollvirus eine ähnliche Umweltstabilität (Persistenz) 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 Teils von ISO 15216 verwendet wurde) ist in Anhang E angeführt.

4.4.2 EC-RNA-Kontrolle

Viele Lebensmittelmatriices enthalten Substanzen, die sich hemmend auf die RT-PCR auswirken. Außerdem besteht die Möglichkeit der Verschleppung von inhibierenden Substanzen aus einem vorhergehenden Aufarbeitungsschritt. Um eine Inhibition der RT-PCR in den einzelnen Proben nachzuweisen, wird eine externe Kontroll-RNA (EC-RNA) (RNA-Spezies, die die zu bestimmende Zielsequenz enthält (5.3.11)) 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. Darüber hinaus dient bei diesem Verfahren die EC-RNA-Kontrolle als eine positive Kontrolle der Real-time-RT-PCR für die Zielviren.

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

4.5 Untersuchungsergebnisse

Bei Lebensmitteloberflächen führt dieses Verfahren zu einem Ergebnis, das entweder als „Virusgenom nachgewiesen“ oder als „Virusgenom nicht nachgewiesen“ angegeben wird, gefolgt von „auf $x \text{ cm}^2$ “, wobei x die ungefähre abgetupfte Oberfläche ist. Falls die Größe der abgetupften Oberfläche nicht dokumentiert werden kann, werden die Ergebnisse als „Virusgenom nachgewiesen“ oder „Virusgenom nicht nachgewiesen“ angegeben. Bei anderen Probenarten werden die Ergebnisse als „Virusgenom nachgewiesen“ oder „Virusgenom nicht nachgewiesen“ gefolgt von „in $x \text{ ml}$ “ oder „in $x \text{ g}$ “ angegeben, wobei x die Menge der untersuchten Probe ist.

5 Reagenzien

5.1 Allgemeines

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

Hinsichtlich der geltenden Laborpraxis siehe ISO 7218 [1].

5.2 Reagenzien, die im Lieferzustand verwendet werden

5.2.1 Wasser für die Molekularbiologie.

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

5.2.3 Natriumchlorid (NaCl).

5.2.4 Kaliumchlorid (KCl).

5.2.5 Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4).

5.2.6 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4).

5.2.7 TRIS (Trishydroxymethylaminomethan) als Base.

5.2.8 Glycin.

5.2.9 Rindfleischextrakt in Pulverform.

5.2.10 Proteinase K.

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

5.2.12 Chloroform.

5.2.13 n-Butanol.

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

5.2.15 Salzsäure (HCl) (≥ 5 mol/l).

5.2.16 Ethylendiamintetraessigsäure (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 (Literaturhinweis [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.

Das RNA-Präparat 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 Teil von ISO 15216 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 Gesamtreaktionsvolumen 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'-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 Teils von ISO 15216 verwendet wurden) siehe Anhang C.

5.2.19 Primer und Hydrolysesonden für den Nachweis von HAV und Norovirus GI und GII. Die Sequenzen von Primern und Hydrolysesonden müssen in einer angesehenen wissenschaftlichen Fachzeitschrift veröffentlicht und ihre Verwendung an einem breiten Spektrum an Virusstämmen getestet worden sein. Primer für den Nachweis von HAV müssen auf den 5'-nicht-codierenden Bereich des Genoms, Primer für den Nachweis von Norovirus GI und GII 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 D.

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

5.3 Herzustellende Reagenzien

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.3.9 Virusmaterial für die Prozesskontrolle. Die Stammlösung des Prozesskontrollvirus ist mindestens mit einem Faktor von 10 in einer geeigneten Pufferlösung, z. B. PBS (5.3.4), zu verdünnen. Diese Verdünnung muss einen inhibitionsfreien Nachweis des Genoms des Prozesskontrollvirus in der Real-time-RT-PCR ermöglichen und noch hinreichend konzentriert sein, um einen reproduzierbaren Nachweis der größten Verdünnung zu ermöglichen, die für die Standardkurve der Prozesskontrollvirus-RNA verwendet wird (8.4.2.2). Das verdünnte Virusmaterial für die Prozesskontrolle wird in Aliquote zur einmaligen Verwendung aufgeteilt und bei -15 °C oder kälter aufbewahrt. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zur Herstellung eines Prozesskontrollvirus (wie bei der Erarbeitung des in diesem Teil von ISO 15216 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 sind in Anlehnung an die Empfehlungen der Reagenzienhersteller zu bestimmen. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zu den Real-time-RT-PCR-Mastermixen (die bei der Erarbeitung dieses Teils von ISO 15216 verwendet wurden) siehe Anhang C.

5.3.11 RNA-Kontrollmaterial für die externe Kontrolle (EC). Als externe Kontroll-RNA ist aufgereinigte Einzelstrang-RNA (ssRNA), die die Zielsequenz für das jeweilige Zielvirus enthält, zu verwenden. Die Kontamination mit Ziel-DNA darf höchstens 0,1 % betragen und darf in der RT-PCR zu keiner Inhibition führen. Die Konzentration der jeweiligen EC-RNA-Stammlösung ist in Kopien je Mikroliter zu bestimmen. Anschließend ist die Stammlösung in einem geeigneten Puffer, z. B. TE-Puffer (5.3.8), auf eine Konzentration von 1×10^2 bis 1×10^5 Template-Kopien je Mikroliter einzustellen. Die verwendete Konzentration muss für die zu untersuchenden Probenarten geeignet sein und sicherstellen, dass die Berechnungen zur RT-PCR-Inhibition nicht durch das Vorhandensein von endogener Ziel-RNA in den Proben beeinträchtigt werden. Da EDTA zu einer Inhibition der RT-PCR führen kann, dürfen die zur Verdünnung der EC-RNA verwendeten Puffer keine EDTA-Konzentrationen von mehr als 1 mmol/l enthalten. Die verdünnte EC-RNA-Präparation (EC-RNA-Kontrollmaterial) wird in Aliquote zur einmaligen Verwendung aufgeteilt und bei $(5 \pm 3)\text{ °C}$ für bis zu 24 h, bei -15 °C oder kälter für bis zu 6 Monate oder bei -70 °C oder kälter für längere Zeiträume aufbewahrt. Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zur Herstellung von EC-RNA (die bei der Erarbeitung dieses Teils von ISO 15216 verwendet wurde) siehe Anhang G.

6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien

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

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

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

6.3 Vortex-Mischer.

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

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

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

6.7 Ansaugvorrichtung oder ein gleichwertiges Gerät zum Entfernen eines Überstands.

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

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

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

6.12 pH-Meter (oder pH-Teststreifen mit Skalierung von 0,5 pH-Einheiten oder niedriger).

6.13 Sterile Wattetupfer.

6.14 Beutel mit Gewebefilter (400 ml).

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

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

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

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

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

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

6.21 Sterile Petrischalen.

6.22 Rasierklingen oder gleichwertiges Werkzeug zum Entfernen der Verdauungsdrüsen der zweischaligen Weichtiere.

6.23 Schutzhandschuhe für hohe Beanspruchung (Kettenhandschuhe).

6.24 Ausrüstung zur RNA-Extraktion, geeignet für Extraktionsverfahren unter Verwendung von Silica und zugehörigen Reagenzien (5.2.17). Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zum RNA-Extraktionsgerät (das bei der Erarbeitung dieses Teils von ISO 15216 angewendet wurde) siehe Anhang F.

6.25 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 Real-time-RT-PCR durch Hydrolyse der Sonde erzeugten Fluoreszenzsignale.

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

7 Probenahme

Liegt keine spezielle Internationale Norm vor, wird den betreffenden Vertragspartnern empfohlen, diesbezüglich eine Vereinbarung zu treffen.

Es ist wichtig, dass das Labor eine wirklich repräsentative Probe erhält, die während des Transports oder der Lagerung nicht beschädigt oder verändert wurde. Beispielsweise sollten Proben, die bei Probenahme eingefroren wurden, vor Eingang im Labor nicht bereits aufgetaut sein. Proben, die bei Probenahme nicht eingefroren wurden, sollten vor Eingang im Labor nicht eingefroren werden.

8 Durchführung

8.1 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien

Die Probenextraktion und die Real-time-RT-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 einer Charge an Untersuchungsproben wird entsprechend der Anzahl an Untersuchungsproben eine ausreichende Anzahl an Aliquoten mit Virusmaterial für die Prozesskontrolle (5.3.10) vereinigt (10 µl Prozesskontrollvirus je Untersuchungsprobe plus 25 µl Überschuss).

Eine Teilmenge von (20 ± 1) µl des vereinten Prozesskontrollvirusmaterials wird für die RNA-Extraktion und für die Erstellung der Standardkurve der Prozesskontrollvirus-RNA (8.4.2.2) bei (5 ± 3) °C für höchstens 24 h oder eingefroren bei -15 °C oder kälter für bis zu 6 Monate oder bei -70 °C oder kälter für längere Zeiträume aufbewahrt.

8.2.2 Negative Prozesskontrolle

Parallel zu den Untersuchungsproben muss eine negative Prozesskontrollprobe mitgeführt werden, deren Häufigkeit im Qualitätssicherungsprogramm des Untersuchungslabors festgelegt wird.

8.2.3 Lebensmitteloberflächen

Mit einem zuvor in PBS (5.3.4) angefeuchteten sterilen Wattetupfer wird die zu untersuchende Oberfläche (maximale Fläche von 100 cm²) mit leichtem Druck zum Ablösen der Viruspartikel intensiv abgetupfert. Sofern dies praktisch möglich ist, wird die Fläche, die abgetupfert wurde, in Quadratzentimeter dokumentiert.

Der Tupfer muss unverzüglich weiterverarbeitet oder in einem geeigneten Behälter bei (5 ± 3) °C für höchstens 72 h oder bei -15 °C oder kälter für bis zu 6 Monate oder bei -70 °C oder kälter für längere Zeiträume aufbewahrt werden.

Es werden $(10 \pm 0,5)$ µl Virusmaterial für die Prozesskontrolle (8.2.1) zu dem Tupfer hinzugefügt.

Unmittelbar nach der Zugabe des Virusmaterials für die Prozesskontrolle wird der Tupfer in ein Röhrchen mit (490 ± 10) µl Lysispuffer getaucht. Anschließend wird er an der Wandung des Röhrchens ausgepresst, um die Flüssigkeit (wieder) freizusetzen. Das Eintauchen und Auspressen wird drei- bis viermal wiederholt, um die maximale Ausbeute an Viren zu gewährleisten.

Danach wird unverzüglich die RNA-Extraktion durchgeführt.

8.2.4 Weiches Obst, Blatt-, Stängel- und Zwiebelgemüse

Für die Analyse müssen weiches Obst und Blatt-, Stängel- und Zwiebelgemüse frisch oder eingefroren sein. Die Proben dürfen nur, wie z. B. bei vorgeschnittenem und verpacktem weichem Obst, Blatt-, Stängel- und Zwiebelgemüse, zerkleinert, geschnitten, gewaschen, dekontaminiert, konditioniert usw., aber nicht anderweitig verarbeitet sein. An der Oberfläche anhaftender Schmutz muss vor der Analyse schonend durch Schrubben entfernt werden, jedoch ohne die Untersuchungsproben in Wasser einzutauchen.

($25 \pm 0,3$) g weiches Obst oder Blatt-, Stängel- oder Zwiebelgemüse werden grob in Stücke von etwa $2,5 \text{ cm} \times 2,5 \text{ cm} \times 2,5 \text{ cm}$ zerkleinert (eine Zerkleinerung ist nicht notwendig, wenn zum Beispiel die einzelnen Früchte kleiner sind) und in die Probenkammer eines 400-ml-Gewebefilterbeutels überführt. ($10 \pm 0,5$) μl Virusmaterial für die Prozesskontrolle (8.2.1) werden zur Probe hinzugefügt. (40 ± 1) ml TGBE (5.3.5) werden hinzugefügt (bei Proben aus weichem Obst werden ≥ 30 Einheiten Pektinase von *A. niger* oder $\geq 1\,140$ Einheiten Pektinase von *A. aculeatus* zur Pufferlösung hinzugegeben).

Die Inkubation erfolgt für (20 ± 1) min bei Raumtemperatur und einer konstanten Schüttel- oder Wippbewegung bei etwa 60 min^{-1} . Bei saurem weichem Obst muss der pH-Wert des Eluats während der Inkubation in Abständen von 10 min überprüft werden. Wenn der pH-Wert unter 9,0 fällt, muss er mit NaOH ($\geq 10 \text{ mol/l}$) auf $9,5 \pm 0,5$ 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 dreimal je Probe eingestellt werden. Das Eluat aus der Filtratkammer wird in ein Zentrifugenröhrchen dekantiert (bei Bedarf werden zwei Röhrchen verwendet, um das Volumen aufzunehmen).

Es wird (30 ± 5) min bei $10\,000 \times g$ und (5 ± 3) °C zentrifugiert.

Der Überstand wird in ein einzelnes sauberes Röhrchen oder eine saubere Flasche dekantiert und der pH-Wert mit HCl ($\geq 5 \text{ mol/l}$) auf $7,0 \pm 0,5$ eingestellt.

0,25 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 Schüttel- oder Wippbewegung von etwa 60 min^{-1} inkubiert.

Es wird (30 ± 5) min bei $10\,000 \times g$ 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 $10\,000 \times g$ 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 ($1\,000 \pm 20$) μl PBS erforderlich sein, um das Pellet vollständig zu resuspendieren. Wenn eine Einzelprobe auf zwei Röhrchen aufgeteilt wurde, werden beide Pellets schrittweise in demselben Aliquot PBS resuspendiert.

Bei der Virusgewinnung aus Blatt-, Stängel- oder Zwiebelgemüse wird die Suspension in ein geeignetes Röhrchen überführt und für die RNA-Extraktion zurückgestellt.

Der Probenextrakt muss unverzüglich weiterverarbeitet oder bei (5 ± 3) °C für höchstens 24 h oder bei -15 °C oder kälter für bis zu 6 Monate oder bei -70 °C oder kälter für längere Zeiträume aufbewahrt werden. Bei der Virusgewinnung aus weichem Obst ist ein weiterer Extraktionsschritt erforderlich. Die Suspension wird in ein 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 wurden, wird das entsprechende Volumen Chloroform/Butanol-Gemisch hinzugefügt.

Es wird (15 ± 1) min bei $10\,000 \times g$ und $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Die wässrige (obere) Phase wird vorsichtig in ein frisches Röhrchen überführt und für die RNA-Extraktion zurückgestellt.

Der Probenextrakt muss unverzüglich weiterverarbeitet oder bei $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ für höchstens 24 h oder bei -15°C oder kälter für bis zu 6 Monate oder bei -70°C oder kälter für längere Zeiträume aufbewahrt werden.

8.2.5 In Flaschen abgefülltes Trinkwasser

Dieser Teil von ISO 15216 ist für Volumina von bis zu 2 l geeignet. Für jede Probe ist das Volumen der Untersuchungsprobe zu dokumentieren.

Es werden $(10 \pm 0,5)$ 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 durch einen positiv geladenen Membranfilter mit einem Durchmesser von 47 mm (6.15) filtriert. Der Filter wird in ein steriles Röhrchen überführt. Anschließend werden $(4 \pm 0,1)$ ml TGBE-Puffer (5.3.5) hinzugefügt.

In die leere Wasserflasche werden $(10 \pm 0,2)$ ml TGBE-Puffer gegeben. Röhrchen und Flasche werden (20 ± 5) min bei konstanten Schüttel- oder Wippbewegungen von etwa 50 min^{-1} geschüttelt.

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

Die Innenwände der Flasche werden mit weiteren $(2 \pm 0,1)$ ml TGBE-Puffer gespült, indem vorsichtig geschüttelt und mit der Hand invertiert wird, und diese Lösung wird in das Röhrchen hinzugegeben.

Die Eluate werden mit HCl ($\geq 5\text{ mol/l}$) auf einen pH-Wert von $7,0 \pm 0,5$ eingestellt und in einen Zentrifugal-Filter-Konzentrator (6.16) überführt.

Es wird (15 ± 1) min bei $4\,000 \times g$ zentrifugiert. Das Konzentrat wird in ein sauberes Röhrchen überführt.

Das Volumen wird mit PBS (5.3.4) auf (500 ± 10) µl eingestellt. Die Lösung wird für die RNA-Extraktion zurückgestellt.

Der Probenextrakt muss unverzüglich weiterverarbeitet oder bei $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ für höchstens 24 h oder bei -15°C oder kälter für bis zu 6 Monate oder bei -70°C oder kälter für längere Zeiträume aufbewahrt werden.

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 muss entfernt werden. BMS dürfen nicht zurück ins Wasser gegeben werden.

Die Schalen von mindestens 10 BMS werden mit einem sterilen Austernmesser oder einem gleichwertigen Werkzeug geöffnet. Beim Öffnen der Schalen ist darauf zu achten, dass die Hand, die das Tier hält, durch Schutzhandschuhe, die einer hohen Beanspruchung standhalten (Kettenhandschuhe), geschützt wird.. Hierbei wird das Tier auf einem Gummiblock oder einer gleichwertigen Vorrichtung stabilisiert.

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

Die Verdauungsdrüsen werden mit einer Rasierklinge oder einem gleichwertigen Werkzeug bis zu einer pastenähnlichen Konsistenz fein zerkleinert. Anschließend wird eine Menge von $(2,0 \pm 0,2)$ g in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Verdauungsdrüsen müssen unverzüglich weiterverarbeitet oder bei $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ für höchstens 24 h, bei -15°C oder kälter für bis zu 6 Monate oder bei -70°C oder kälter für längere Zeiträume aufbewahrt werden (verbleibendes Drüsengewebe nach Entnahme der Probe von $(2,0 \pm 0,2)$ g kann bei -15°C oder kälter für bis zu 6 Monate oder bei -70°C oder kälter für längere Zeiträume aufbewahrt werden). Es werden $(10 \pm 0,5)$ µl Virusmaterial für die Prozesskontrolle (8.2.1) direkt zur Menge von $(2,0 \pm 0,2)$ g hinzugegeben.

$(2,0 \pm 0,2)$ ml Proteinase-K-Lösung (5.3.3) werden hinzugefügt und es wird gemischt. Unter Schütteln bei konstanten Schüttel- oder Wippbewegungen von ungefähr 320 min^{-1} wird (60 ± 5) min bei $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ in einem Schüttelinkubator (6.5) oder ähnlichem Gerät inkubiert.

Anschließend wird (15 ± 1) min bei $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$ in einem Wasserbad oder ähnlichem Gerät ein zweites Mal inkubiert.

Es wird bei Raumtemperatur $(5,0 \pm 0,5)$ min bei $3\,000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird in ein sauberes Röhrchen dekantiert. Das Volumen des Überstands wird in Milliliter gemessen und dokumentiert (üblicherweise werden Volumina von 2,0 ml bis 3,0 ml erhalten). Der Überstand wird für die RNA-Extraktion zurückgestellt.

Der Überstand muss unverzüglich weiterverarbeitet oder bei $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ für höchstens 24 h, bei -15°C oder kälter für bis zu 6 Monate oder bei -70°C oder kälter für längere Zeiträume aufbewahrt werden.

8.3 RNA-Extraktion

Die RNA 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 aufgereinigte RNA wird in (100 ± 2) µl Elutionspuffer eluiert und für die Analyse mit der Real-time-RT-PCR zurückgestellt.

Die extrahierte RNA muss unverzüglich weiterverarbeitet oder bei $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ für höchstens 24 h oder bei -15°C oder kälter für bis zu 6 Monate oder bei -70°C oder kälter für längere Zeiträume aufbewahrt werden. Bei jeder Charge an untersuchten Proben muss eine negative Extraktionskontrolle mitgeführt werden, es sei denn, es ist bereits eine negative Prozesskontrolle (8.2.2) mitenthalten. Die RNA-Extraktion muss unter paralleler Anwendung desselben Verfahrens wie bei den Proben unter Verwendung von (500 ± 10) µl Wasser (5.2.1) erfolgen.

Hinsichtlich erläuternder Einzelheiten zum Verfahren für die RNA-Extraktion (das bei der Erarbeitung dieses Teils von ISO 15216 verwendet wurde) siehe Anhang F.

8.4 Real-time-RT-PCR

8.4.1 Allgemeine Anforderungen

Die Mindestanforderungen an die Amplifikation und den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen mittels Real-time-RT-PCR sind in ISO 22174, ISO 22119 und ISO 20838 festgelegt.

In diesem Teil von ISO 15216 werden Verfahren für den Nachweis von HAV, Norovirus GI und Norovirus GII festgelegt.

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 GI oder Norovirus GII) in einer Untersuchungsprobe und umfasst sämtliche empfohlenen Kontrollen. Laboratorien, die auf mehr als ein Zielvirus untersuchen möchten, müssen das Reaktionsformat entsprechend mit zusätzlichen Untersuchungen anpassen. Eine typische Plattenbelegung ist in Anhang H dargestellt.

Ergebnisse, die mithilfe von 10^{-1} verdünnter Proben-RNA erhalten wurden, werden nur in dem Fall verwendet, dass die RT-PCR-Inhibition außerhalb des Bereichs akzeptabler Parameterwerte für unverdünnte Proben-RNA liegt (der C_q -Wert der unverdünnten Proben-RNA + EC-RNA ist $\geq 2,00$ größer als der C_q -Wert von Wasser + EC-RNA) (9.3). Bei Matrices, in denen die RT-PCR-Inhibition üblicherweise innerhalb des Bereichs der akzeptablen Parameterwerte liegt (Lebensmitteloberflächen, in Flaschen abgefülltes Wasser, BMS), ist es den Laboratorien daher erlaubt, die Verdünnung der Proben-RNA von 10^{-1} in der Erstanalyse des Zielvirus und des Prozesskontrollvirus wegzulassen. In diesem Fall, in dem die RT-PCR-Inhibition außerhalb des Bereichs akzeptabler Parameterwerte für unverdünnte Proben-RNA liegt, muss die Analyse mit der Real-time-RT-PCR für alle betroffenen Zielviren und für das Prozesskontrollvirus mit einer Verdünnung der Proben-RNA von 10^{-1} wiederholt werden. Bei der Erstanalyse von weichem Obst, Blatt-, Stängel- oder Zwiebelgemüse (Matrices, in denen die RT-PCR-Inhibition häufig außerhalb des Bereichs akzeptabler Parameterwerte liegt) darf die Verdünnung der Proben-RNA von 10^{-1} nicht weggelassen werden.

Die Verwendung eines alternativen Verfahrens für die RT-PCR-Inhibitionskontrolle ist zulässig, wenn nachweislich ein gleichwertiges Ergebnis wie bei der Verwendung von EC-RNA erzielt wird.

8.4.2 Analyse mit Real-time-RT-PCR

8.4.2.1 Untersuchung auf das Zielvirus

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

Für jede Untersuchungsprobe werden vorbereitet:

- zwei Vertiefungen einer PCR-Platte mit $(5 \pm 0,5)$ μl unverdünnter Proben-RNA;
- zwei Vertiefungen mit $(5 \pm 0,5)$ μl einer Verdünnung der Proben-RNA von 10^{-1} ;
- eine Vertiefung mit $(5 \pm 0,5)$ μl unverdünnter Proben-RNA und $(1 \pm 0,2)$ μl unverdünnter EC-RNA (5.3.11);
- eine Vertiefung mit $(5 \pm 0,5)$ μl einer Verdünnung der Proben-RNA von 10^{-1} und $(1 \pm 0,2)$ μl unverdünnter EC-RNA.

Für die EC-RNA-Kontrolle wird vorbereitet:

- eine Vertiefung mit $(5 \pm 0,5)$ μl Wasser (5.2.1) und $(1 \pm 0,2)$ μl unverdünnter EC-RNA.

Für die Negativkontrollen werden vorbereitet:

- zwei Vertiefungen mit $(5 \pm 0,5)$ μl Wasser (5.2.1);
- zwei Vertiefungen mit $(5 \pm 0,5)$ μl der negativen Extraktionskontrolle oder der RNA für die negative Prozesskontrolle.

In jede Vertiefung werden (20 ± 1) μl des entsprechenden Real-time-RT-PCR-Mastermixes (5.3.10) hinzugefügt (der Mastermix darf auch vor Zugabe des Templates in die jeweiligen Vertiefungen gegeben werden).

ANMERKUNG Das oben Genannte beschreibt den Fall, in dem unverdünnte Proben-RNA und eine Verdünnung der Proben-RNA von 10^{-1} gleichzeitig geprüft werden. Wird die RNA nur in einer Konzentration (8.4.1) geprüft, sind die Vertiefungen mit der anderen Konzentration wegzulassen.

8.4.2.2 Nachweis des Prozesskontrollvirus

Für jede Charge an Untersuchungsproben werden $(10 \pm 0,5)$ µl Virusmaterial für die Prozesskontrolle einem separaten Anteil von (500 ± 10) µl Wasser hinzugefügt. Die RNA wird daraus mit dem gleichen Verfahren und unter den gleichen Bedingungen wie die Untersuchungsproben (8.3) extrahiert und aufbewahrt.

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

Für jede Charge des Prozesskontrollvirusmaterials werden Verdünnungen der Prozesskontrollvirus-RNA von 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} in Wasser (5.2.1) oder 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-RNA verwendeten Puffer keine EDTA-Konzentrationen von mehr als 1 mmol/l enthalten.

Für jede Untersuchungsprobe werden vorbereitet:

- eine Vertiefung mit $(5 \pm 0,5)$ µl unverdünnter Proben-RNA;
- eine Vertiefung mit $(5 \pm 0,5)$ µl einer Verdünnung der Proben-RNA von 10^{-1} .

Für die Standardkurve der Prozesskontrollvirus-RNA werden vorbereitet:

- eine Vertiefung mit $(5 \pm 0,5)$ µl unverdünnter Prozesskontrollvirus-RNA;
- eine Vertiefung mit $(5 \pm 0,5)$ µl einer Verdünnung der Prozesskontrollvirus-RNA von 10^{-1} ;
- eine Vertiefung mit $(5 \pm 0,5)$ µl einer Verdünnung der Prozesskontrollvirus-RNA von 10^{-2} ;
- eine Vertiefung mit $(5 \pm 0,5)$ µl einer Verdünnung der Prozesskontrollvirus-RNA von 10^{-3} .

Für die Negativkontrollen werden vorbereitet:

- eine Vertiefung mit $(5 \pm 0,5)$ µl Wasser (5.2.1);
- eine Vertiefung mit $(5 \pm 0,5)$ µl der negativen Extraktionskontrolle oder der RNA für die negative Prozesskontrolle.

In jede Vertiefung werden (20 ± 1) µl des Real-time-RT-PCR-Mastermixes für das Prozesskontrollvirus (5.3.10) hinzugefügt (der Mastermix darf auch vor Zugabe des Templates in die jeweiligen Vertiefungen gegeben werden).

ANMERKUNG Das oben Genannte beschreibt den Fall, in dem unverdünnte Proben-RNA und eine Verdünnung der Proben-RNA von 10^{-1} gleichzeitig geprüft werden. Wird die RNA nur in einer Konzentration (8.4.1) geprüft, sind die Vertiefungen mit der anderen Konzentration wegzulassen.

8.4.2.3 Amplifikation

Die Platte wird einem Reaktions-Zyklus unterzogen, der den initialen Schritt der reversen Transkription und mindestens 45 PCR-Zyklen unter Verwendung des Real-time-PCR-Geräts (6.26) beinhaltet. Dauer und Temperatur der einzelnen Schritte (reverse Transkription, RT-Deaktivierung, Denaturierung, Annealing, Elongation) sind abhängig von den verwendeten Reagenzien. Sie müssen 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 dieses Teils von ISO 15216 verwendet wurde) siehe Anhang C.

8.4.2.4 Analyse der Fluoreszenzdaten

Die Mindestanforderungen an die Auswertung von Amplifikationsdaten sind in ISO 22174 festgelegt. Die Amplifikationskurven sind nach den Empfehlungen des Herstellers des Real-time-PCR-Geräts 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 (Reaktionen mit C_q -Werten ohne exponentielle Amplifikation) zu identifizieren, die durch ein zu hohes oder ungleichmäßiges Hintergrundsignal bedingt sind. 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 Berechnungen der Effizienz sind die korrigierten C_q -Werte zu verwenden.

9 Auswertung der Ergebnisse

9.1 Allgemeines

Jede Kontrolle (EC-RNA, Prozesskontrollvirus-RNA) hat einen erwarteten validen Wert oder Wertebereich. Wenn das verzeichnete Ergebnis für eine beliebige Kontrolle von dem zu erwartenden Ergebnis abweicht, kann es erforderlich sein, die Proben erneut zu untersuchen.

Negativkontrollen [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.

Wird bei einem doppelten Reaktionsansatz für eine Probe ein positives und für die andere ein negatives Ergebnis erhalten, dann ist das Gesamtergebnis dieser Probe als positiv zu bewerten.

9.2 Erstellen der Standardkurve für die Prozesskontrollvirus-RNA

Die Ergebnisse der Verdünnungsreihe mit Prozesskontrollvirus-RNA werden für die Erstellung der Standardkurve der jeweiligen Kontrolle verwendet. Hierzu werden die ermittelten C_q -Werte gegen die $\log_{10}$ -Konzentrationswerte aufgetragen, um r^2 (wobei r der Pearsonsche Korrelationskoeffizient ist) sowie die Parameter Steigung und Achsenabschnitt zu bestimmen.

Kurven mit einem r^2 -Wert von $< 0,980$ oder einer Steigung, die nicht zwischen $-3,10$ und $-3,60$ liegt (entsprechend einer Amplifikationseffizienz von $\sim 90\%$ bis 110%), dürfen für die Berechnungen nicht verwendet werden. In diesen Fällen werden die C_q -Werte der Standardkurve auf Werte außerhalb des Toleranzbereichs geprüft und diese Werte aus der Serie entfernt. Es darf allerdings nicht mehr als ein solcher C_q -Wert, der außerhalb des Toleranzbereichs liegt, je Serie entfernt werden.

Die Berechnungen werden wiederholt, um r^2 sowie die Parameter Steigung und Achsenabschnitt zu bestimmen. Modifizierte Kurven mit einem r^2 -Wert von $< 0,980$ oder einer Steigung, die nicht zwischen $-3,10$ und $-3,60$ liegt, dürfen für die Berechnungen nicht verwendet werden.

9.3 Kontrolle auf Inhibition der RT-PCR

Wenn der C_q -Wert der Probe "unverdünnten Proben-RNA + EC-RNA" um $< 2,00$ größer ist als der C_q -Wert von "Wasser + EC-RNA", müssen bei dieser Probe die Ergebnisse für die unverdünnte RNA verwendet werden. Wenn der C_q -Wert von "unverdünnten Proben-RNA + EC-RNA" um $\geq 2,00$ größer ist als der C_q -Wert von "Wasser + EC-RNA", so wird der Vergleich mit " 10^{-1} verdünnte Proben-RNA + EC-RNA" wiederholt.

Wenn der C_q -Wert von " 10^{-1} verdünnte Proben-RNA + EC-RNA" um $< 2,00$ größer ist als der C_q -Wert von "Wasser + EC-RNA", müssen bei dieser Probe die Ergebnisse der Probe " 10^{-1} verdünnte RNA" verwendet werden. Wenn der C_q -Wert von " 10^{-1} verdünnten Proben-RNA + EC-RNA" um $\geq 2,00$ größer ist als der C_q -Wert von "Wasser + EC-RNA", ist es möglich, dass die Ergebnisse nicht gültig sind und die Probe erneut untersucht werden muss.

ANMERKUNG 1 Das oben Genannte beschreibt den Fall, in dem unverdünnte Proben-RNA und eine Verdünnung der Proben-RNA von 10^{-1} gleichzeitig geprüft werden. Wenn in der ersten Runde (8.4.1) nur die unverdünnte Proben-RNA geprüft wird und wenn der C_q -Wert der "unverdünnte Proben-RNA + EC-RNA" um $\geq 2,00$ größer ist als der C_q -Wert von "Wasser + EC-RNA", muss die Real-time-RT-PCR unter Verwendung einer Verdünnung der Proben-RNA von 10^{-1} wiederholt und die Berechnung mithilfe der Ergebnisse aus der wiederholten Analyse erneut erfolgen.

ANMERKUNG 2 Eine Probe, die eine nicht akzeptierbare RT-PCR-Inhibition aufweist, jedoch zu einem ansonsten gültigen positiven Ergebnis führt, kann gegebenenfalls als positiv angegeben werden, wie in Abschnitt 10 beschrieben.

ANMERKUNG 3 Für den Fall, dass der C_q -Wert der "unverdünnte Proben-RNA + EC-RNA" um $< 2,00$ größer ist als der C_q -Wert von "Wasser + EC-RNA", jedoch nur mit der 10^{-1} verdünnten Proben-RNA positive Ergebnisse erhalten werden, müssen bei dieser Probe die Ergebnisse für die 10^{-1} verdünnte RNA verwendet werden.

ANMERKUNG 4 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

Zur Abschätzung der Wiederfindung des Prozesskontrollvirus wird der C_q -Wert für die Prozesskontrolle mit der Proben-RNA (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-RNA gesetzt (wenn die Ergebnisse der 10^{-1} verdünnten Proben-RNA verwendet werden, wird zur Korrektur des Verdünnungsfaktors mit 10 multipliziert):

$$\text{Wiederfindung des Prozesskontrollvirus} = 10^{(\Delta C_q/m)} \times 100 \%$$

Dabei ist

$$\Delta C_q = C_q\text{-Wert [Proben-RNA]} - C_q\text{-Wert [unverdünnte Prozesskontrollvirus-RNA];}$$

m = die Steigung der Standardkurve für die Prozesskontrollvirus-RNA.

Bei BMS-Proben wird die Extraktionseffizienz berechnet, indem wie folgt auf die Wiederfindung des Prozesskontrollvirus Bezug genommen wird:

$$\text{Extraktionseffizienz} = (p/0,5) \times v$$

Dabei ist

p = die Wiederfindungsrate des Prozesskontrollvirus;

v = das gemessene Gesamtvolumen des Überstands in ml (8.2.6).

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

Bei einer Extraktionseffizienz $< 1 \%$ sind die Ergebnisse für die Probe nicht gültig und die Probe muss gegebenenfalls erneut untersucht werden.

Vorausgesetzt, die Prozesskontrollvirus-RNA-Standardkurve weist eine idealisierte Steigung von $-3,32$ auf, hat eine Untersuchungsprobe (ausgenommen BMS) mit $\Delta C_q = 0,00$ eine Extraktionseffizienz von 100% und eine Untersuchungsprobe mit $\Delta C_q = 6,64$ hat eine Extraktionseffizienz von 1% . Wenn $\Delta C_q \leq 6,64$ ist, so ist die Extraktionseffizienz $\geq 1 \%$ und deshalb akzeptierbar. Wenn $\Delta C_q > 6,64$ ist, so ist die Extraktionseffizienz $< 1 \%$ und deshalb nicht akzeptierbar.

Bei bestimmten Sorten von weichem Obst, Blatt-, Stängel- bzw. Zwiebelgemüse oder BMS, für die keine offiziellen Validierungsdaten vorliegen, dürfen nach angemessener Auswertung alternative Schwellenwerte für die Extraktionseffizienz verwendet werden.

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

10 Angabe der Ergebnisse

Positive Ergebnisse für jedes Zielvirus sind bei Lebensmitteloberflächen als „Virusgenom nachgewiesen auf $x \text{ cm}^2$ “ anzugeben, falls die ungefähre Oberfläche dokumentiert werden kann. Wenn die ungefähre Oberfläche nicht dokumentiert werden kann, sind positive Ergebnisse als „Virusgenom nachgewiesen“ anzugeben. Bei anderen Probenarten sind positive Ergebnisse als „Virusgenom nachgewiesen in $x \text{ ml}$ “ oder „Virusgenom nachgewiesen in $x \text{ g}$ “ anzugeben, wobei x die Menge der untersuchten Probe ist.

Wird das Zielvirus nicht nachgewiesen, sind Ergebnisse bei Lebensmitteloberflächen als „Virusgenom auf $x \text{ cm}^2$ nicht nachgewiesen“ anzugeben, falls die ungefähre Oberfläche dokumentiert werden kann. Wenn die ungefähre Oberfläche nicht dokumentiert werden kann, sind die Ergebnisse als „Virusgenom nicht nachgewiesen“ anzugeben. Bei anderen Probenarten sind die Ergebnisse als „Virusgenom in $x \text{ ml}$ nicht nachgewiesen“ oder „Virusgenom in $x \text{ g}$ nicht nachgewiesen“ anzugeben.

Wird kein gültiges Ergebnis erhalten, müssen die Ergebnisse üblicherweise als „ungültig“ angegeben werden. Wenn jedoch von einer Probe mit einer nicht akzeptablen RT-PCR-Inhibition oder Extraktionseffizienz ein ansonsten gültiges positives Ergebnis erhalten wird, dürfen die Ergebnisse, wie vorstehend ausführlich beschrieben, angegeben werden. Einzelheiten sind im Untersuchungsbericht anzuführen.

11 Leistungsmerkmale des Verfahrens

11.1 Validierungsstudie

Die Leistungsmerkmale des Verfahrens wurden in einer Validierungsstudie ermittelt, die sowohl in einzelnen Labors als auch in einer internationalen Ringstudie durchgeführte Untersuchungen umfasste; dabei wurden die Spezifität, die Empfindlichkeit und die LOD_{50} des Verfahrens bestimmt. Die Daten sind in Anhang I zusammengefasst. Die aus der Validierungsstudie abgeleiteten Werte sind nicht unbedingt auf andere Lebensmittelarten als die in Anhang I angegebenen anwendbar.

11.2 Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit (Sensitivität) ist definiert als die Anzahl der als positiv ermittelten Proben dividiert durch die Anzahl der bei einem vorgegebenen Kontaminationsgrad untersuchten Proben. Die Ergebnisse hängen somit vom Kontaminationsgrad der Probe ab.

11.3 Spezifität

Die Spezifität ist definiert als die Anzahl der als negativ ermittelten Proben dividiert durch die Anzahl der untersuchten Leerwertproben.

11.4 LOD₅₀

Die LOD₅₀ (Nachweisgrenze) ist die Konzentration, für die die Wahrscheinlichkeit des Nachweises 50 % beträgt.

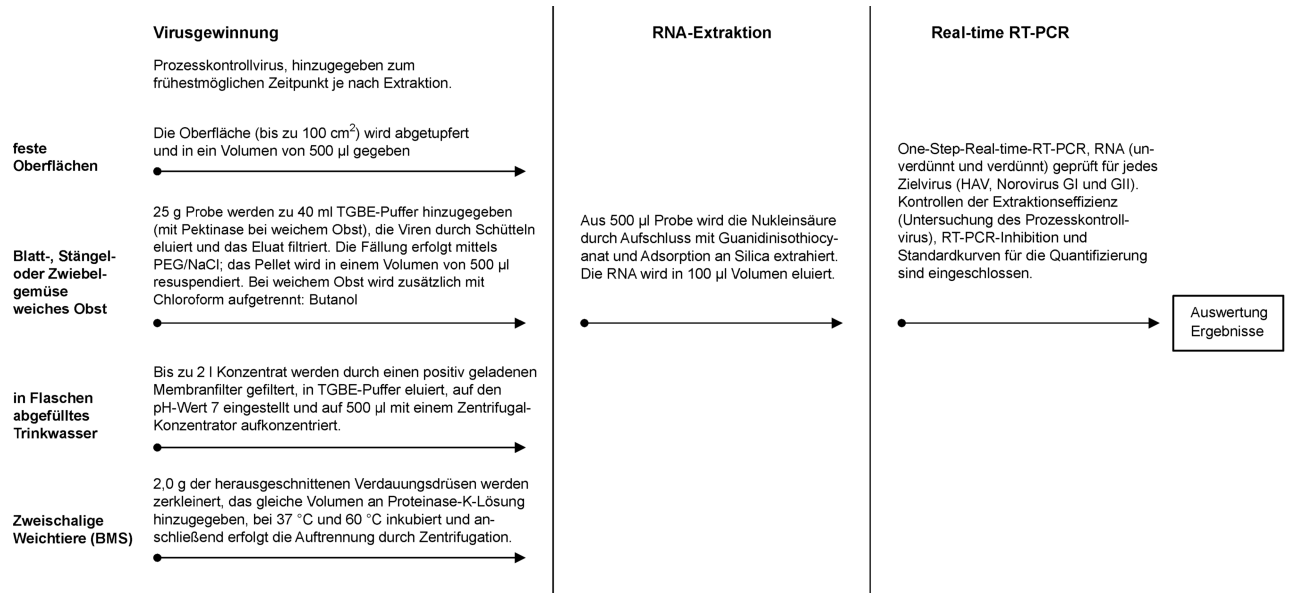
12 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens folgende Informationen enthalten:

- a) sämtliche zur vollständigen Identifizierung der Probe notwendigen Angaben;
- 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 Extraktionseffizienz der Probe (9.4);
- f) das (die) erhaltene(n) Untersuchungsergebnis(se), angegeben nach Abschnitt 10.

Anhang A (normativ)

Schematische Darstellung des Verfahrens



Anhang B (normativ)

Zusammensetzung und Herstellung von Reagenzien und Pufferlösungen

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

B.1.1 Zusammensetzung

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

B.1.2 Herstellung

Die Feststoffe werden in (450 ± 5) ml Wasser 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.

Die Lösung wird bei Raumtemperatur für höchstens 6 Monate aufbewahrt.

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

B.2.1 Zusammensetzung

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

B.2.2 Herstellung

Die Bestandteile werden gemischt.

Die Lösung wird bei Raumtemperatur für höchstens 12 Monate aufbewahrt.

B.3 Proteinase-K-Lösung (3 000 U/l)

B.3.1 Zusammensetzung

Proteinase K	nach Bedarf (siehe unten)
steriles Wasser	(200 ± 2) ml

B.3.2 Herstellung

Anhand der spezifischen Aktivität der Proteinase K laut Herstellerangaben wird die Menge berechnet, die benötigt wird, um eine Lösung mit 600 Einheiten des Enzyms zu erhalten (z. B. wird bei einer spezifischen Aktivität von 30 U/mg eine Menge von 20 mg benötigt).

Diese Menge Proteinase K wird in Wasser gelöst. Alles wird gründlich gemischt.

Die Lösung wird in Arbeitsvolumina bei –15 °C oder kälter für höchstens 6 Monate aufbewahrt. Einmal aufgetaut, ist die Lösung bei (5 ± 3) °C aufzubewahren und innerhalb einer Woche zu verbrauchen.

B.4 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, en: Phosphate-buffered saline)

B.4.1 Zusammensetzung

NaCl	$(8,0 \pm 0,1)$ g
Kaliumchlorid	$(0,2 \pm 0,01)$ g
Dinatriumhydrogenphosphat	$(1,15 \pm 0,01)$ g
Kaliumdihydrogenphosphat	$(0,2 \pm 0,01)$ g
Wasser	$(1\,000 \pm 10)$ ml

B.4.2 Herstellung

Die Feststoffe werden in dem Wasser gelöst. Falls nötig, wird der pH-Wert bei 25 °C auf $7,3 \pm 0,2$ eingestellt. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

Die Lösung wird bei (5 ± 3) °C für höchstens 6 Monate aufbewahrt.

B.5 TRIS/Glycin/Rindfleischextrakt-Puffer (TGBE-Puffer; en: Tris/glycine/beef extract buffer)

B.5.1 Zusammensetzung

TRIS als Base [Tris(hydroxymethyl)aminomethan]	$(12,1 \pm 0,2)$ g
Glycin	$(3,8 \pm 0,1)$ g
Rindfleischextrakt	$(10 \pm 1,0)$ g
Wasser	$(1\,000 \pm 10)$ ml

B.5.2 Herstellung

Die Feststoffe werden in dem Wasser gelöst. Falls nötig, wird der pH-Wert bei 25 °C auf $9,5 \pm 0,2$ eingestellt. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

Die Lösung wird bei (5 ± 3) °C für höchstens 6 Monate aufbewahrt.

B.6 TRIS-Lösung (1 mol/l)

B.6.1 Zusammensetzung

TRIS als Base [<i>Tris</i> (hydroxymethyl)aminomethan]	$(12,1 \pm 0,2)$ g
Wasser (5.2.1)	nach Bedarf

B.6.2 Herstellung

TRIS als Base wird in (90 ± 1) ml Wasser gelöst. Falls nötig, wird der pH-Wert bei 25 °C auf $8,0 \pm 0,2$ eingestellt. Das Volumen wird mit Wasser auf (100 ± 1) ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

Die Lösung wird bei (5 ± 3) °C für höchstens 6 Monate aufbewahrt.

B.7 EDTA-Lösung (0,5 mol/l)

B.7.1 Zusammensetzung

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	(18,6 ± 0,2) g
Dinatriumsalz- Dihydrat	
Wasser (5.2.1)	nach Bedarf

B.7.2 Herstellung

EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat wird in (90 ± 1) ml Wasser gelöst. Falls nötig, wird der pH-Wert bei 25 °C auf $8,0 \pm 0,2$ eingestellt. Das Volumen wird mit Wasser auf (100 ± 1) ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

Die Lösung wird bei (5 ± 3) °C für höchstens 6 Monate aufbewahrt.

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

B.8.1 Zusammensetzung

TRIS-Lösung (1 mol/l) (B.6)	(1 000 ± 10) µl
EDTA-Lösung (0,5 mol/l) (B.7)	(200 ± 10) µl
Wasser (5.2.1)	(100 ± 1) ml

B.8.2 Herstellung

Die Bestandteile werden gemischt.

Die Lösung wird bei (5 ± 3) °C für höchstens 6 Monate aufbewahrt.