

DIN EN ISO 20813



ICS 67.050

Einsprüche bis 2022-10-12

Entwurf

**Untersuchung auf molekulare Biomarker –
Verfahren zur Identifizierung und zum Nachweis von Tierarten in
Lebensmitteln (Nukleinsäureverfahren) –
Allgemeine Anforderungen und Definitionen (ISO 20813:2019);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 20813:2022**

Molecular biomarker analysis –
Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food
products (nucleic acid-based methods) –
General requirements and definitions (ISO 20813:2019);
German and English version prEN ISO 20813:2022

Analyse moléculaire de biomarqueurs –
Méthodes d'analyse pour la détection et l'identification des espèces animales dans les
aliments et les produits alimentaires (méthodes basées sur l'utilisation des acides
nucléiques) –
Exigences générales et définitions (ISO 20813:2019);
Version allemande et anglaise prEN ISO 20813:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-08-12 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 oder Am DIN-Platz, 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 69 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 20813:2019 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als prEN ISO 20813:2022 durch das Technische Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ übernommen, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-08-02-02 AK „Molekularbiologische Speziesanalytik“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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

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

ISO 24276	siehe	DIN EN ISO 24276
ISO 5725-1:1994	siehe	DIN ISO 5725-1:1997-11
ISO 17034	siehe	DIN EN ISO 17034:2017-04
ISO 21569	siehe	DIN EN ISO 21569
ISO 21571:2005	siehe	DIN EN ISO 21571:2013-08
ISO/IEC 17025	siehe	DIN EN ISO/IEC 17025

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

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 24276, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Allgemeine Anforderungen und Definitionen*

DIN EN ISO 17034:2017-04, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Referenzmaterialherstellern (ISO 17034:2016); Deutsche und Englische Fassung EN ISO 17034:2016*

DIN EN ISO 21569, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren*

DIN EN ISO 21571:2013-08, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Nukleinsäureextraktion (ISO 21571:2005 + Amd 1:2013); Deutsche Fassung EN ISO 21571:2005 + A1:2013*

DIN ISO 5725-1:1997-11, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe (ISO 5725-1:1994)*

DIN EN ISO/IEC 17025, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*

– *Entwurf* –

E DIN EN ISO 20813:2022-09

– Leerseite –

Untersuchung auf molekulare Biomarker – Verfahren zur Identifizierung und zum Nachweis von Tierarten in Lebensmitteln (Nukleinsäureverfahren) – Allgemeine Anforderungen und Definitionen (ISO 20813:2019)

Molecular biomarker analysis – Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food products (nucleic acid-based methods) – General requirements and definitions (ISO 20813:2019)

Analyse moléculaire de biomarqueurs – Méthodes d'analyse pour la détection et l'identification des espèces animales dans les aliments et les produits alimentaires (méthodes basées sur l'utilisation des acides nucléiques) – Exigences générales et définitions (ISO 20813:2019)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Leistungsmerkmale der Verfahren	7
4.1 Allgemeines	7
4.2 Anwendungsbereich des Verfahrens	7
4.3 Wissenschaftliche Grundlage	7
4.4 Maßeinheiten	7
4.5 Anwendbarkeit	7
4.6 Spezifität	8
4.6.1 Allgemeines	8
4.6.2 Anforderungen an die Untersuchung der Inklusivität	8
4.6.3 Anforderungen an die Untersuchung der Exklusivität	9
4.7 Empfindlichkeit	9
4.7.1 Allgemeines	9
4.7.2 Nachweisgrenze (LOD)	9
4.8 Spezifische Anforderungen an quantitative Verfahren	10
4.8.1 Allgemeines	10
4.8.2 Bestimmungsgrenze (LOQ)	10
4.8.3 Dynamischer Bereich	11
4.8.4 Bestimmung von Präzision und Richtigkeit bei quantitativen Verfahren	11
4.9 Robustheit	11
4.9.1 Allgemeines	11
4.9.2 Bestimmung der Robustheit durch eine Laborvergleichsuntersuchung	12
4.9.3 Bestimmung der Robustheit durch einen mehrfaktoriellen orthogonalen Versuchsplan	12
5 Einzellaborvalidierung	12
6 Laborvergleichsuntersuchung (Ringversuch)	12
6.1 Allgemeines	12
6.2 Qualitative Verfahren	13
6.3 Quantitative Verfahren	13
7 Allgemeine Anforderungen an Laboratorium und Durchführung	13
7.1 Allgemeines	13
7.2 Einrichtungen, Materialien und Ausstattung	13
7.3 Probenvorbereitung und DNA-Extraktion	14
7.4 Einsatz von Kontrollen	15
7.5 Datenanalyse	16
7.5.1 Kontrolle	16
7.5.2 Konventionelle PCR	17
7.5.3 Real-time-PCR-Amplifikationskurven	17
7.6 Angabe der Ergebnisse	17
7.6.1 Angabe der positiven Ergebnisse	17
7.6.2 Angabe der negativen Ergebnisse	18
7.6.3 Angabe der quantitativen Ergebnisse	18
8 Untersuchungsbericht	18
Anhang A (informativ) Liste typischer, für die Untersuchung der Inklusivität und Exklusivität verwendeter Arten	19
Anhang B (informativ) Beispiele für Umrechnungsverfahren von DNA-Kopienzahlen in Massenanteil	25
B.1 Allgemeines	25

B.2	Beispiel für die Umrechnung von Messergebnissen, die als Verhältnis der DNA-Kopienzahlen angegeben sind, in den Massenanteil unter Verwendung von Referenzmaterialien	25
B.3	Beispiel einer relativen quantitativen Bestimmung des Gehalts an Tierarten in Fleischerzeugnissen	26
B.3.1	Als Massenanteil angegebene Analysenergebnisse	26
B.3.2	Umrechnung von Messergebnissen, die als Kopienzahl je haploidem Genomäquivalent (cp/HGE) angegeben sind, in Massenanteil	26
B.4	Beispiel für die Berechnung mit der Kopienzahl von Single-copy-Genen	33
	Literaturhinweise	34

Bilder

Bild B.1	— Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten zur Messung des in einer Probe vorhandenen Gehalts an tierischen Bestandteilen	27
----------	---	----

Tabellen

Tabelle 1	— Fließdiagramm, das die Schnittstellen aufeinanderfolgender Schritte und die Einbeziehung von Kontrollen darstellt	15
Tabelle A.1	— Beispiel relevanter Säugetiere	19
Tabelle A.2	— Beispiel relevanter Vögel	20
Tabelle A.3	— Beispiel relevanter Reptilien	20
Tabelle A.4	— Beispiel relevanter Amphibien	20
Tabelle A.5	— Beispiel relevanter Fische	21
Tabelle A.6	— Beispiel relevanter Weichtiere	22
Tabelle A.7	— Beispiel relevanter Schalentiere	22
Tabelle A.8	— Beispiel relevanter Insekten	23
Tabelle B.1	— Real-time-PCR-basierte Quantifizierungsstrategie	28
Tabelle B.2	— Genomgrößen zur Berechnung der Genomkopien	29
Tabelle B.3	— Herstellung von Kalibrierstandards	32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20813:2022) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 20813:2019 wurde von CEN als prEN ISO 20813:2022 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Vorwort

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

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

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

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

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

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 16, *Horizontal methods for molecular biomarker analysis* erarbeitet.

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

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt die Mindestanforderungen an die Leistungsmerkmale für den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen (DNA) durch molekulare Verfahren, wie z.B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), einschließlich verschiedener Post-PCR-Nachweisverfahren, Real-time-PCR, auf Einzel- und/oder Mehrfachsonden basierender Nachweisverfahren sowie der Kombination derartiger Verfahren, fest.

Das Dokument ist anzuwenden für den Nachweis, die Identifizierung und die quantitative Bestimmung von DNA von Tierarten höherer und niedrigerer taxonomischer Gruppen in Lebensmitteln sowie für die Validierung der entsprechenden Verfahren.

Es ist anzuwenden für Säugetiere, Vögel, Reptilien, Amphibien, Fische, Weichtiere, Schalentiere und Insekten. Jeweils typische Beispiele sind in Anhang A aufgeführt.

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 16577, *Molecular biomarker analysis — Terms and definitions*

ISO 24276, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 16577, ISO 24276 und die folgenden Begriffe.

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

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

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

3.1

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST

hinsichtlich der Geschwindigkeit optimierter Algorithmus zum Sequenzvergleich, der zum Durchsuchen von Sequenzdatenbanken nach optimalen lokalen Alignments mit einer Abfragesequenz genutzt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieser Algorithmus approximiert direkt Alignments, die ein Maß für die lokale Ähnlichkeit, den Punktwert für das Signalpaar mit maximalem Signal (MST; maximum signal pair) oder den Punktwert für ein Segmentpaar mit hohem Punktwert (HSP, en: high-scoring segment pair), optimieren.

Anmerkung 2 zum Begriff: Siehe Literaturhinweis [2].

Anmerkung 3 zum Begriff: BLASTn ist auf den Vergleich von Nukleotidsequenzen anwendbar.

3.2

konventionelle Polymerase-Kettenreaktion

konventionelle PCR

PCR-Verfahren, das einen Post-PCR-Schritt, wie z. B. Gelelektrophorese, zum Nachweis oder zur Sichtbarmachung von Amplifikationsprodukten erfordert, um ein qualitatives Ergebnis zu erhalten

4 Leistungsmerkmale der Verfahren

4.1 Allgemeines

Die zur Analyse von Tierarten anzuwendenden Verfahren müssen die Leistungsmerkmale nach diesem Dokument erfüllen. Die Ergebnisse aller Ringversuchs- und/oder Einzellaborvalidierungen und die Leistungsmerkmale müssen beschrieben werden.

ANMERKUNG Bezüglich der Umsetzung von Verfahren stehen einige Leitlinien zur Verfügung, siehe Literaturhinweis [10].

4.2 Anwendungsbereich des Verfahrens

Informationen bezüglich der vorgesehenen Anwendung und der Einschränkungen der Verfahren müssen bereitgestellt werden. Insbesondere müssen die Informationen darauf hinweisen, dass die in diesem Dokument festgelegten Kriterien erfüllt wurden.

4.3 Wissenschaftliche Grundlage

Ein Überblick über die Grundsätze und Verweise auf relevante wissenschaftliche Veröffentlichungen sollten zur Verfügung gestellt werden.

4.4 Maßeinheiten

Qualitative Analysen zeigen das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein (Fehlen eines Nachweises) eines bestimmten Ziels (Targets) an.

Bei quantitativen Analysen wird der gemessene Wert als Verhältnis der Kopienzahlen der DNA (c/c) berechnet. Mit Hilfe dieses Verhältnisses sollten mögliche Einflüsse untersucht werden, einschließlich der Anzahl der DNA-Kopien in Bezug auf das Ziel im Genom. Andere Einheiten (z. B. Verhältnis der Massen/Massenanteil) können verwendet werden. Die Grundsätze für die Berechnung des Verhältnisses müssen im Bericht angegeben werden.

Wenn ein quantitatives Verfahren zur Beurteilung des Massenanteils der von verschiedenen Tierarten stammenden Inhaltsstoffe (Zutaten) in einer Probe bestimmt ist, sollte darauf hingewiesen werden, dass die für das DNA-Kopienzahlverhältnis gemessenen Werte nicht in allen Fällen den Massenanteil der tierischen Bestandteile in der Probe widerspiegeln können.

4.5 Anwendbarkeit

Bei der Beurteilung, ob ein Verfahren gebrauchstauglich ist, sollten die folgenden Aspekte in Bezug auf die Beschaffenheit des Targets berücksichtigt werden:

- der Ort, an dem sich das Target befindet (nukleär oder mitochondrial);
- die Kopienzahl je Zelle;
- die Länge der Zielsequenz.

Bei quantitativen, artspezifischen (speziesspezifischen) Verfahren muss ein Zellkerngen, ohne mitochondriale DNA, angestrebt werden. Die Zielsequenz muss als Einzelkopie im haploiden Genom vorliegen oder die Kopienzahl muss bestimmt werden/bekannt sein.

Bei der Beurteilung, ob ein Verfahren gebrauchstauglich ist, sollten die folgenden Aspekte in Bezug auf die Matrix berücksichtigt werden:

- die Beschaffenheit der potentiellen Probenmatrices;

- der Grad der Verarbeitung der Probenbestandteile;
- die verschiedenen beteiligten Arten und tierischen Gewebetypen;
- die Vorbereitung der Probenmatrix.

Die Anwendbarkeit des Verfahrens muss durch Extraktion der DNA aus Untersuchungsproben, die die Matrices und den Analyseumfang widerspiegeln, untersucht werden.

Die DNA sollte aus mindestens drei Matrices der relevantesten Typen extrahiert werden, einschließlich der Typen, die den Anwendungsbereich des Verfahrens widerspiegeln und die einen bekannten (prozentualen) Massengehalt an Materialien der Zielart(en) (gleichmäßig über den prozentualen dynamischen Bereich des Verfahrens verteilt) und an für die Anwendung relevanten Geweben enthalten.

ANMERKUNG 1 Mitochondriale PCR-Targets können nicht für eine zuverlässige quantitative Bestimmung von Kopienzahlverhältnissen haploider Genome verschiedener Arten verwendet werden, weil sich die Anzahl mitochondrialer Targets in Abhängigkeit vom Gewebetyp unterscheidet.

ANMERKUNG 2 Verschiedene tierische Gewebetypen können unterschiedliche DNA-Gehalte je Massenäquivalent aufweisen.

ANMERKUNG 3 Die praktische Nachweisgrenze (LOD) (siehe ISO 21569) kann sich für verschiedene Matrices signifikant unterscheiden. Darüber hinaus tragen unterschiedliche Verarbeitungsgrade von tierischen Bestandteilen in ein und demselben Produkt zum DNA-Abbau und einer möglichen asymmetrischen DNA-Verteilung zwischen den Inhaltsstoffen bei. Zum Beispiel kann ein Produkt aus verschiedenen Typen von tierischem Gewebe bestehen, die unterschiedliche Mengen an DNA enthalten. Dieses Ungleichgewicht kann noch verstärkt werden, wenn einige Inhaltsstoffe vorverarbeitet wurden, z. B. durch Kochen oder Säurebehandlung, wodurch sich die DNA-Qualität verschlechtert, während andere Inhaltsstoffe zum Beispiel roh hinzugefügt oder anders verarbeitet wurden.

4.6 Spezifität

4.6.1 Allgemeines

Die Spezifität sollte in einem zweistufigen Verfahren beurteilt werden: theoretische und experimentelle Bewertung der Inklusivität (Maß der spezifischen Erfassung) und Exklusivität (Ausschlusssicherheit).

Es muss eine In-silico-Untersuchung der Spezifität von Primern und Sonden mit verfügbaren bioinformatischen Werkzeugen durchgeführt werden.

ANMERKUNG 1 Beispiele sind die Prüfung der Bildung von Primer-Dimeren mit primer3 [1] und BLAST [2]-Recherchen in Nukleinsäuresequenzdatenbanken.

Wenn Sequenzdaten für die Verifizierung der Ergebnisse der Bestimmung von Tierarten verwendet werden, sollten sie auf geeigneten Datenbanken beruhen, wobei der Zeitpunkt der Einreichung der einzelnen Einträge und alle spätere Änderungen der taxonomischen Klassifikation oder Benennung gebührend zu berücksichtigen sind.

ANMERKUNG 2 Bei unerwarteten Ergebnissen können weitere Untersuchungen mit geeigneten Techniken, wie z. B. Sequenzierung, Gelelektrophorese oder Hybridisierungsverfahren, durchgeführt werden, um die Identität des Referenzmaterials zu bestätigen.

4.6.2 Anforderungen an die Untersuchung der Inklusivität

Es sollten experimentelle Ergebnisse der Untersuchung des Verfahrens mit Ziel-Tierarten bereitgestellt werden. Diese Untersuchung sollte alle relevanten Rassen von Tierarten entsprechend dem Anwendungsbereich des Verfahrens (siehe 4.2) einschließen.

Material für die experimentelle Untersuchung der Inklusivität sollte annähernd 100 Kopien der Ziel-DNA enthalten [6]. Jedes Probenmaterial muss mindestens als Doppelbestimmung untersucht werden. Sequenzvarianten der Ziel-Tierarten sollten mit vergleichbarer Amplifikationseffizienz nachgewiesen werden, falls sie auftreten.

ANMERKUNG Bei den Ziel-Tierarten für die Untersuchung der Inklusivität handelt es sich üblicherweise um mehr als fünf Rassen.

4.6.3 Anforderungen an die Untersuchung der Exklusivität

Es müssen experimentelle Ergebnisse der Untersuchung des Verfahrens mit Nicht-Ziel-Tierarten bereitgestellt werden. Diese Untersuchung sollte sowohl taxonomisch eng als auch nicht eng verwandte Tierarten umfassen. Tierarten oder taxonomische Gruppen, die in Bezug auf den Anwendungsbereich des Verfahrens relevant sind, müssen untersucht werden, z. B. Arten, die üblicherweise in Lebensmitteln im Allgemeinen und insbesondere in Matrices, die im Anwendungsbereich des Verfahrens betrachtet werden, verwendet werden. Das Verfahren sollte eindeutig zwischen Ziel- und Nicht-Ziel-Arten unterscheiden.

Für die experimentelle Untersuchung der Exklusivität sollte ausreichend DNA verwendet werden. Eine Anzahl von 2 500 Zielkopien [6] stellt sicher, dass eine Kreuzreaktivität festgestellt werden kann.

Es werden mindestens 10 Arten ausgewählt, die Störungen bei den Ziel-Tierarten verursachen könnten, die im als Untersuchungsmaterial dienenden Lebensmittel vorliegen. Beispiele für geeignete Organismen sind in Anhang A aufgeführt.

Falls relevant, sollten andere Arten einbezogen werden, z. B. wenn Sequenzhomologien von Oligonukleotiden zu Nukleinsäuresequenzen vorliegen.

Eine Kreuzreaktivität der Matrix sollte charakterisiert werden.

Die Eignung der für die Amplifikation verwendeten DNA sollte durch eine Amplifikationskontrolle bestätigt werden, z. B. durch ein Consensus-PCR-System auf der Grundlage einer Einzelkopie (chromosomaler) DNA (z. B. Myostatin oder Actin).

4.7 Empfindlichkeit

4.7.1 Allgemeines

Experimentelle Ergebnisse der Untersuchung des Verfahrens bei unterschiedlichen Konzentrationen zur Untersuchung des gesamten Anwendungsbereichs des Verfahrens müssen zur Verfügung stehen. Sie müssen im Validierungsbericht beschrieben werden.

Falls zutreffend, sollten detaillierte Informationen darüber vorgelegt werden, wie ein Cut-off-Wert festgelegt und im Laboratorium verwendet werden kann.

Tierarten, die eine qualitative Untersuchung erfordern, sollten in Konzentrationen nachgewiesen werden, die für die interessierte Partei, z. B. den Verbraucher, relevant sind.

4.7.2 Nachweisgrenze (LOD)

4.7.2.1 Absolute LOD

Die absolute LOD (LOD_{abs}) muss in Kopienzahlen der Zielsequenz je Reaktion mit einem festgelegten Vertrauensniveau (üblicherweise 95 %) angegeben werden.

ANMERKUNG 1 Zwanzig Kopien oder weniger können bei Single-copy-Genen und eine angemessene Anzahl haploider Genomäquivalente bei Genen mit hoher Kopienzahl verwendet werden.

ANMERKUNG 2 Wenn für die Bestimmung der LOD keine DNA mit bekannter Kopienzahl der Zielsequenz zur Verfügung steht, kann Plasmid-DNA verwendet werden.

Die LOD_{abs} des Verfahrens wird experimentell bestimmt, indem eine Verdünnungsreihe des Zielmaterials mit Verdünnungen im Bereich der erwarteten/angestrebten Nachweisgrenze hergestellt wird. Ein Leitfaden zur Beurteilung der LOD_{abs} ist in Literaturhinweis [6] beschrieben.

4.7.2.2 Relative LOD

Die relative LOD (LOD_{rel}) muss in der DNA von relevanten Nicht-Ziel-Tierarten als Hintergrund bestimmt werden. In Abhängigkeit von den Prüfanforderungen wird die LOD_{rel} auf diesen Wert eingestellt. Die LOD_{rel} gibt das relative Verhältnis $c/c\%$ der DNA der Ziel-Tierart in der DNA anderer Tierarten an, das mit einer (statistischen) Sicherheit von 95 % nachgewiesen wird.

Die LOD_{rel} sollte experimentell bestimmt werden, indem eine oder mehrere definierte Referenzproben mit festgelegtem prozentualen Gehalt an Ziel-DNA im Bereich der Nachweisgrenze hergestellt werden. Jede Referenzprobe wird in mindestens 10 Parallelbestimmungen analysiert. Der Prozentsatz der Referenzprobe, bei dem mindestens 95 % der Parallelbestimmungen positive Ergebnisse liefern, wird als LOD_{rel} angesehen.

4.7.2.3 Asymmetrische LOD (nur bei Multiplex-Verfahren)

Im Falle von Multiplex-Verfahren, bei denen der Nachweis verschiedener Targets durch Konkurrenzwirkungen eingeschränkt ist, wie bei Multiplex-Real-time-PCR-Verfahren, muss die LOD für die einzelnen Targets in einer asymmetrischen Target-Situation, angegeben als Target-Verhältnis, validiert werden. Unterschiedliche Gehalte der spezifischen tierischen Zielsequenz werden gemischt, um festgelegte Kopieverhältnisse zu erhalten (d. h. Verhältnisse von 1 : 1 000 und 1 000 : 1, 1 : 100 und 100 : 1). Das Verhältnis, bei dem jedes Zieltier mit 95%iger Sicherheit nachgewiesen wird, wird experimentell mit einer angemessenen Anzahl von Wiederholungen für die festgelegte Referenzprobe bestimmt.

4.8 Spezifische Anforderungen an quantitative Verfahren

4.8.1 Allgemeines

Die obere und untere Grenze des linearen Bereiches des Verfahrens müssen bestimmt werden. Die Beurteilung dieser Grenzen und des linearen Bereichs muss an Proben durchgeführt werden, die eine für das Lebensmittelprodukt relevante tierische Nicht-Ziel-DNA enthalten.

4.8.2 Bestimmungsgrenze (LOQ)

Die absolute LOQ (LOQ_{abs}) muss als Kopienzahlen der Zielsequenz angegeben werden. Sie muss gleich der kleinsten im dynamischen Bereich enthaltenen Menge sein.

Die relative LOQ (LOQ_{rel}) muss in der DNA anderer relevanter Tierarten bestimmt werden. In Abhängigkeit von den Prüfanforderungen sollte die LOQ_{rel} auf diesen Wert eingestellt werden. Die LOQ_{rel} gibt das Verhältnis der Kopienzahl der DNA der Ziel-Tierart zu den Kopien der DNA anderer Tierarten oder zu den DNA-Kopien eines für den gesamten taxonomischen Rang repräsentativen Referenzgens an. Die LOQ_{rel} sollte gleich der kleinsten im dynamischen Bereich enthaltenen Konzentration sein.

Wenn für die Bestimmung der LOQ keine DNA mit bekannter Kopienzahl der Zielsequenz zur Verfügung steht, sollte Plasmid-DNA verwendet werden. Dieses Plasmid kann auch als Kalibriermaterial dienen.

Mindestens 15 Parallelproben mit einer Zielkonzentration der erwarteten LOQ müssen untersucht werden. Die Ergebnisse müssen die Kriterien für Präzision und Richtigkeit erfüllen.

ANMERKUNG Die LOQ-Werte, die auf der Grundlage von Ringversuchsdaten angegeben werden, beziehen sich im Allgemeinen auf den niedrigsten Gehalt des Analyten, bei dem eine relative Vergleichsstandardabweichung von 25 % oder weniger beobachtet wurde.

4.8.3 Dynamischer Bereich

Der dynamische Bereich sollte die Prozentwerte sowie die Kopienzahlen entsprechend der erwarteten Anwendung und dem Anwendungsbereich des Verfahrens erfassen.

Um die relevante Mindestkopienzahl festzulegen, muss der gewünschte dynamische Bereich in Form von prozentualen Anteilen der Zielkopien bestimmt werden. Es sollte beachtet werden, dass die Genomgröße der Art im erwarteten Probenmaterial die maximale Kopienzahl, die für die Analyse verwendet werden kann (z. B. 100 ng bis 200 ng, in Abhängigkeit vom Verfahren), begrenzt.

ANMERKUNG 1 Bei Rindern kann zum Beispiel von einer Genomgröße von 4 pg ausgegangen werden, woraus sich eine maximale Kopienzahl von 25 000 in 100 ng Proben-DNA-Material ergibt. Siehe Tabelle B.2 [18] [22].

Die Kopienzahlen des dynamischen Bereichs sowohl für die Ziel- als auch die Referenzsequenz müssen anschließend wie folgt bestimmt werden:

- für die Referenzsequenz kann die maximale Kopienzahl unter Berücksichtigung der Genomgrößen und der Menge der für die Analyse verwendeten Proben-DNA wie vorstehend beschrieben berechnet werden;
- für die Zielsequenz sollte die niedrigste Kopienzahl die absolute LOQ sein; als Voraussetzung sollte der niedrigstmögliche Wert unter Berücksichtigung des Verhältnisses zur maximalen Kopienzahl der Gesamt-/Referenz-DNA in Betracht gezogen werden;
- die Mindestkopienzahl der Referenzsequenz und die maximale Kopienzahl für die Zielsequenz sollten durch das Verhältnis des minimalen bzw. maximalen Prozentwertes angegeben werden.

ANMERKUNG 2 Der dynamische Bereich wird auf der Grundlage einer Standardkurve mit mindestens vier gleichmäßig verteilten Konzentrationswerten in mindestens zweifacher Ausführung festgelegt.

ANMERKUNG 3 Für eine gewünschte obere Grenze des prozentualen dynamischen Bereichs von 100 % kann die Mindestkopienzahl der Referenzsequenz gleich der unteren Grenze des Kopienzahlbereichs der Zielsequenz sein, und für eine gewünschte LOQ von 0,1 % bei einer absoluten LOQ von 30 Kopien ist die obere Grenze der Referenzzelsequenz 30 000 Kopien.

4.8.4 Bestimmung von Präzision und Richtigkeit bei quantitativen Verfahren

Die Präzision sollte bestimmt und als relative Wiederholstandardabweichung (S_r) angegeben werden.

Es sollte eine ausreichende Anzahl von Parallelproben (mindestens 15) für mindestens drei DNA-Materialien mit unterschiedlichen prozentualen Anteilen der Zielsequenzen analysiert werden, die den gesamten dynamischen Bereich erfassen.

ANMERKUNG Mitochondriale DNA kann nicht für die Targets quantitativer Verfahren verwendet werden.

Die S_r für alle Parallelproben muss über den gesamten dynamischen Bereich des Verfahrens ≤ 25 % sein.

Die Richtigkeit muss bei allen Parallelproben über den gesamten dynamischen Bereich des Verfahrens innerhalb von 25 % des anerkannten Referenzwertes liegen.

4.9 Robustheit

4.9.1 Allgemeines

Falls vorhanden, sollten Ergebnisse der empirischen Untersuchung des Verfahrens auf geringe, jedoch absichtliche Änderungen in den Parametern des Verfahrens (z. B. Änderung der Konzentration von Testkit-Komponenten, Änderungen in der Geräteausrüstung usw.) angegeben werden.

4.9.2 Bestimmung der Robustheit durch eine Laborvergleichsuntersuchung

Eine Laborvergleichsuntersuchung bringt absichtliche Änderungen in dem Laboratorium ein, das das Verfahren durchführt, und erfüllt die Kriterien für die Bewertung der Robustheit. Empirisch muss ein robustes Verfahren ausgewählt werden, indem berücksichtigt wird, dass die Ergebnisse verschiedener Laboratorien nicht signifikant voneinander abweichen.

4.9.3 Bestimmung der Robustheit durch einen mehrfaktoriellen orthogonalen Versuchsplan

Die Untersuchung sollte im Rahmen eines mehrfaktoriellen Ansatzes durchgeführt werden, bei dem mehrere Änderungen, unter anderem der Mastermix-Konzentration, des Reaktionsvolumens, der Primer- und Sondenkonzentration, der Annealing-Temperatur und der Thermocycler-Plattform, beurteilt werden.

ANMERKUNG 1 Eine ausführliche Verfahrensweise ist in Literaturhinweis [6] beschrieben.

Bei qualitativen Verfahren sollten mindestens drei Parallelproben untersucht werden. Die in der Untersuchung verwendete Kopienzahl der Ziel-Tierart sollte in einer Konzentration vorliegen, die dem Dreifachen der LOD_{abs} (95%ige Sicherheit) des Verfahrens entspricht.

Bei quantitativen Verfahren sollten drei festgelegte Zielkonzentrationen über den gesamten dynamischen Bereich des Verfahrens in jeweils drei Wiederholungen untersucht werden.

ANMERKUNG 2 Das Verfahren wird als robust angesehen, wenn alle Reaktionen die erwarteten Ergebnisse liefern.

5 Einzellaborvalidierung

Ein Analysenverfahren sollte innerhalb eines Laboratoriums ausreichend geprüft worden sein, um die erforderliche Spezifikation vor der Laborvergleichsuntersuchung offenzulegen, siehe ISO 13495.

Die Verwendung von Referenzmaterialien oder zertifizierten Referenzmaterialien (ZRM) sollte bei der Validierung von Nachweis- und Quantifizierungsverfahren für Nukleinsäuren in Betracht gezogen werden.

6 Laborvergleichsuntersuchung (Ringversuch)

6.1 Allgemeines

Informationen über den Ringversuch (Organisator, Arbeitsvorschrift, Anzahl der teilnehmenden Laboratorien usw.) und die im Rahmen des Versuchs gewonnenen Leistungsdaten müssen mit entsprechenden Verweisen auf die einschlägigen Dokumente angegeben werden. Ringersuche zur Validierung von PCR-Verfahren zum Nachweis, zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung spezifischer DNA-Sequenzen können nach anderen einschlägigen Dokumenten durchgeführt werden (z. B. Codex Alimentarius CAC/GL 74-2010 [7]).

ANMERKUNG Ein Ringversuch in kleinem Maßstab (Vorvalidierungsstudie, an der zum Beispiel zwei bis vier Laboratorien beteiligt sind) kann durchgeführt werden, um die allgemeine Übertragbarkeit des Verfahrens zu prüfen, bevor der Aufwand für die Organisation eines groß angelegten Versuchs entsteht.

Für die Validierung der Präzision von Nachweis- und Identifizierungsverfahren werden Daten von mehreren Laboratorien gesammelt, die über Einrichtungen und Fertigkeiten für molekularbiologische Untersuchungen verfügen. In ISO 13495:2013 beträgt die erforderliche Anzahl von Laboratorien acht und vier für die internationale bzw. nationale Ebene der Validierung. Nach AOAC International (2002) [23] beträgt die erforderliche Anzahl acht Laboratorien. Die Berechnungen für die statistische Analyse erfolgen auf der Grundlage von ISO 5725-1:1994, 6.3.

6.2 Qualitative Verfahren

Ein Ringversuch zur Validierung eines qualitativen PCR-Verfahrens muss unter Berücksichtigung der Nachweiswahrscheinlichkeit (POD, en: probability of detection) (siehe ISO/TS 16393) innerhalb des Bereichs des Verfahrens geplant werden.

ANMERKUNG Traditionelle nichtparametrische 5 % falsch positive und 5 % falsch negative Anteile spiegeln POD von 5 % und 95 % wider.

6.3 Quantitative Verfahren

Die relative Vergleichstandardabweichung (S_R) sollte über den gesamten dynamischen Bereich des Verfahrens ≤ 25 % sein.

ANMERKUNG Bei Werten von 0,1 % (Kopie/Kopie) kann eine S_R von 50 % annehmbar sein.

7 Allgemeine Anforderungen an Laboratorium und Durchführung

7.1 Allgemeines

Das Verfahren muss dokumentiert werden und die folgenden Schritte umfassen:

- die Repräsentativität der Probe muss berücksichtigt werden;
- Vorbereiten der Untersuchungsprobe (optional: wenn die Untersuchungsprobe nicht die gesamte Laborprobe ist, wird die Laborprobe homogenisiert und die Untersuchungsproben werden nach den entsprechenden Internationalen Normen entnommen);
- Zerkleinern/Mahlen und Homogenisieren der Untersuchungsprobe;
- Vorbereitung der Einwaagen;
- Extraktion der DNA;
- Untersuchung, Auswertung und Bericht der Ergebnisse.

Empfehlungen des Herstellers zur Sicherheit müssen eingehalten werden.

7.2 Einrichtungen, Materialien und Ausstattung

Der Arbeitsbereich im Laboratorium sollte so gestaltet sein, dass eine zufällige Kontamination mit DNA, zum Beispiel durch Staub, menschliches Material und sich ausbreitende Aerosole, verhindert wird, einschließlich der Berücksichtigung:

- der systematischen Abgrenzung der methodisch aufeinander folgenden Arbeitsschritte, die bei der Ermittlung von Ergebnissen beteiligt sind;
- des Prinzips der „Einbahnstraße“ (en: forward flow) bei der Probenhandhabung.

Bei DNA-basierten Verfahren ist eine (zeitliche und/oder physische) Trennung von Tätigkeiten erforderlich, um eine Kontamination zu verhindern. Es werden folgende gekennzeichnete abgegrenzte/zugeordnete Arbeitsbereiche mit eigener Geräteausrüstung empfohlen:

- a) ein Arbeitsbereich für das Mahlen und die Homogenisierung;
- b) ein Arbeitsbereich für die Extraktion der Nukleinsäure aus dem Untersuchungsmaterial;

- c) ein Arbeitsbereich für das Ansetzen von PCR/Amplifikationsreaktionen;
- d) ein Arbeitsbereich für nachfolgende Verfahrensschritte, einschließlich der Analyse und Charakterisierung der amplifizierten DNA-Sequenzen, sofern anwendbar.

Wenn mit dem Verfahren menschliche DNA nachgewiesen wird, sollten geeignete Maßnahmen zur Vorbeugung von Kontaminationen (z. B. Verwendung von Masken, Handschuhen und Einwegkitteln) ergriffen werden, um falsch-positive Ergebnisse durch Kontamination mit der DNA des Bearbeiters oder anderer Personen während der Analyse zu verhindern.

Eine physische Trennung durch die Nutzung verschiedener Räume ist der wirksamste und vorzuziehende Weg zur Sicherstellung getrennter Arbeitsbereiche, es können jedoch auch andere Verfahren als Schutz vor Kontamination Anwendung finden, eine vergleichbare Wirksamkeit vorausgesetzt. Das Luftstromsystem sollte so eingestellt und ausgerichtet sein, dass das Eindringen von Staub/Amplifikaten (Amplikons) aus Arbeitsbereichen mit höherem Kontaminationsrisiko in Arbeitsbereiche mit geringerem Kontaminationsrisiko verhindert wird.

Sofern nicht anders festgelegt, sollten für die Analyse nur Reagenzien von analytischer Qualität verwendet werden, die für die Molekularbiologie geeignet sind und keine DNA und DNasen enthalten. Die Reagenzien und Lösungen sollten bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, sofern nicht anders festgelegt. PCR-Reagenzien sollten in Form von kleinen aliquoten Teilen aufbewahrt werden, um das Risiko einer Kontamination auf ein Mindestmaß zu verringern. Das verwendete Wasser muss doppelt destilliert, deionisiert (vollentsalzt) oder von vergleichbarer Qualität sein. Sofern nicht anders festgelegt, sollten die Lösungen durch Lösen der entsprechenden Reagenzien in Wasser hergestellt und autoklaviert werden. Wenn das Autoklavieren nicht möglich ist, dürfen Vorrichtungen für die Sterilfiltration (mögliche Porengröße 0,22 µm) angewendet werden.

Zur Vermeidung von Kontamination sollte in dem PCR-Ansatz-Bereich sterile Technik angewendet werden, z. B. sollten puderfreie Handschuhe, sterilisierte Kunststoffwaren, autoklavierte Reagenzien, Kunststoffwaren zum Einmalgebrauch, aerosolgeschützte, DNA/RNA-freie und DNase/RNase-freie Pipettenspitzen mit Filter verwendet werden.

Materialien sowie sämtliche Behälter und Einwegartikel mit Reagenzien müssen vor allen verunreinigenden Stoffen (z. B. Staub) geschützt werden.

Die Empfehlungen der Hersteller zum Gebrauch der Reagenzien sollten befolgt werden. Zur Beurteilung der Integrität von Reagenzien und des Nichtvorhandenseins von DNase können geeignete Kontrollen verwendet werden.

Im Ansatz dürfen keine ungewollten Enzymaktivitäten (z. B. Exonuklease) enthalten sein, die die PCR beeinflussen könnten. Der Reaktionspuffer muss für die verwendete Polymerase geeignet sein.

7.3 Probenvorbereitung und DNA-Extraktion

Es sollte eine repräsentative Probe untersucht werden. Es muss sichergestellt werden, dass die für die DNA-Extraktion verwendeten Untersuchungsproben für die Laborprobe repräsentativ sind, wie z. B. durch Homogenisieren der Probe oder geeigneter Anteile davon. Von der homogenisierten Laborprobe sollten mindestens zwei aliquote Teile als Einwaagen für die DNA-Extraktion und die anschließende Analyse entnommen werden.

Das Probenmaterial sollte nach Möglichkeit nicht von der Oberfläche der Laborprobe entnommen werden, um das Risiko der Amplifikation anhaftender Kontaminanten zu minimieren.

Wenn das für die Probe anzuwendende Analysenverfahren menschliche DNA nachweist, sollten besondere Maßnahmen zur Vorbeugung von Kontaminationen getroffen werden.

Hinsichtlich der Isolierung der DNA aus der Einwaage sollten die in ISO 21571 beschriebenen allgemeinen Anweisungen und Maßnahmen befolgt werden. Eines der in ISO 21571:2005, Anhang A beschriebenen DNA-

Extraktionsverfahren sollte in Betracht gezogen werden. Alternativ können für die Extraktion und Reinigung von DNA handelsübliche Kits verwendet werden.

7.4 Einsatz von Kontrollen

Die Kontrollen sollte nach Tabelle 1 durchgeführt werden (siehe auch ISO 24276).

Negative DNA-Zielkontrollen sollten aus DNA hergestellt werden, die aus in der Probe vorherrschenden Nicht-Zielarten extrahiert wurde (z. B. bei einer Untersuchung auf Pferd in Rinderfleisch ist die Nicht-Zielart Rind).

Tabelle 1 — Fließdiagramm, das die Schnittstellen aufeinanderfolgender Schritte und die Einbeziehung von Kontrollen darstellt

Kontrollschritt	Umgebungs-kontrolle^b	Negative Extraktions-kontrolle^c	Positive Extraktions-kontrolle^d	Positive DNA-Ziel-kontrolle^e	Negative DNA-Ziel-kontrolle^f	PCR-Reagenzien-kontrolle^g	PCR-Inhibitions-kontrolle^h
Homogenisieren	Empfohlen	—	—	—	—	—	—
Nukleinsäure-extraktion	↓ ^a	Eine je Reihe	Verbindlich vorgeschrieben in regelmäßigen Zeitabständen	—	—	—	—
Beurteilung der Nukleinsäure-qualität	↓	↓	↓	—	—	—	—
Nukleinsäure-amplifikation	↓	↓	↓	Verbindlich vorgeschrieben	Empfohlen	Verbindlich vorgeschrieben	Empfohlen, jedoch in bestimmten Fällen ⁱ verbindlich vorgeschrieben
Beurteilung der Ergebnisse der Nukleinsäure-amplifikation	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Tabelle 1 (*fortgesetzt*)

Kontroll-schritt	Umgebungs-kontrolle ^b	Negative Extraktions-kontrolle ^c	Positive Extraktions-kontrolle ^d	Positive DNA-Ziel-kontrolle ^e	Negative DNA-Ziel-kontrolle ^f	PCR-Reagenzien-kontrolle ^g	PCR-Inhibitions-kontrolle ^h
Auswertung	—	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Untersuchungs-bericht	—	↓	↓	↓	↓	↓	↓

^a Die Pfeile geben an, dass die Kontrolle in den darauffolgenden analytischen Schritten angewandt werden sollte.

^b Die Anwendung von Umgebungskontrollen hilft dem Laboratorium, Kontaminationsquellen in einem frühen Stadium zu identifizieren, und kann verwendet werden, um festzustellen, in welchem Arbeitsbereich die Kontamination vorliegt. Dies kann auf verschiedene Weise gezeigt werden, z. B. wenn negative Proben in einer Reihe von homogenisierten Proben negative Ergebnisse ergaben, beginnend mit dem ersten Schritt des Prozesses (z. B. mit dem Zerkleinerungsschritt, falls relevant).

^c Bei jeder DNA-Extraktion aus einer oder mehreren Proben muss mindestens eine negative Extraktionskontrolle enthalten sein. Das Reaktionsgefäß muss immer das letzte in einer Reihe sein. Das Anordnen einer negativen Extraktionskontrolle auf z. B. einem Gestell mit acht Reaktionsgefäßen oder auf einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen zur automatischen Extraktion kann sinnvoll sein.

^d Eine positive Extraktionskontrolle muss regelmäßig einbezogen werden. Diese Kontrolle lässt erkennen, ob die Reagenzien oder die Ausführung der Extraktionsvorschrift fehlerhaft sind.

^e Die positive DNA-Zielkontrolle weist nach, dass das Verfahren der Nukleinsäureamplifikation in der Lage ist, die Ziel-DNA-Sequenz bei einer geringen Kopienzahl nachzuweisen, um die LOD zu bestätigen.

^f Die negative DNA-Zielkontrolle weist nach, dass das Verfahren der Nukleinsäureamplifikation in der Lage ist, falsch positive Amplifikation zu vermeiden, wenn die Ziel-DNA-Sequenz nicht vorhanden ist.

^g Die PCR-Reagenzienkontrolle weist nach, dass die verwendeten Chargen des PCR-Reagenzes nicht durch Nukleinsäuren verunreinigt (kontaminiert) worden sind. Die PCR-Reagenzienkontrolle ist nicht erforderlich, wenn eine negative Extraktionskontrolle verwendet wird.

^h Die PCR-Inhibitionskontrolle kann zum Nachweis des Nichtvorhandenseins von löslichen Inhibitoren verwendet werden. Dies kann auch durch Reihenverdünnung der als Matrize verwendeten Nukleinsäure nachgewiesen werden. Es muss jedoch irgendeine Art der Einschätzung des Einflusses von löslichen Inhibitoren auf die Ergebnisse der Analyse der Probe erfolgen.

ⁱ Eine PCR-Inhibitionskontrolle ist verbindlich vorgeschrieben, wenn alle PCR-Untersuchungen der Probe zu negativen Ergebnissen führen.

7.5 Datenanalyse

7.5.1 Kontrolle

Jede Kontrolle muss einen validen (gültigen) Wert haben; weicht das beobachtete Ergebnis einer beliebigen Kontrolle von dem validen Wert ab, muss die Analyse wiederholt werden. Umgebungskontrollen mit einem positiven Ergebnis müssen immer zu Maßnahmen zur Beseitigung und Vorbeugung einer Kontamination der Laborumgebung Anlass geben. Falls bei einer der anderen Kontrollen wiederholt ein nicht valides Ergebnis erhalten wird, müssen Maßnahmen ergriffen werden, um die für den Fehler verantwortliche(n) Quelle(n) zu ermitteln und zu beseitigen/zu ersetzen, und die Analyse muss anschließend wiederholt werden. Analysenergebnisse dürfen nur im Bericht angegeben werden, wenn alle Kontrollen valide Werte ergeben; die validen Werte für die Kontrollen sind:

- negative Extraktionskontrollen müssen immer negativ sein;
- positive Extraktionskontrollen müssen immer positiv sein;
- negative Ergebnisse müssen immer negativ sein (negative Ergebnisse von Proben sind valid, auch wenn die negative DNA-Zielkontrolle nicht valid ist, sofern alle anderen Kontrollen valid sind);
- positive DNA-Zielkontrollen müssen immer positiv sein;
- negative DNA-Zielkontrollen sollten immer negativ sein;

- PCR-Reagenzienkontrollen müssen immer negativ sein;
- PCR-Inhibitionskontrollen dürfen bei Proben mit negativen qualitativen Ergebnissen und bei Proben mit quantitativen Ergebnissen keine signifikanten inhibitorischen Effekte aufweisen.

Die vorstehend angeführten Kontrollen müssen zur Auswertung/Berichterstattung des Ergebnisses der Untersuchungsproben verwendet werden.

7.5.2 Konventionelle PCR

Die durch konventionelle PCR erzeugten Amplifikate müssen die erwartete Länge aufweisen (z. B. Sichtbarmachung durch Gelelektrophorese). Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, kann die Verifizierung des erhaltenen Amplifikats durch Hybridisierung, Sequenzierung, Restriktionsenzymanalyse oder ein anderes geeignetes sequenzspezifisches Verifizierungsverfahren zusätzlich zur Bestätigung der Länge durchgeführt werden.

ANMERKUNG Die Schmelzkurvenanalyse wird manchmal zur Verifizierung des Amplifikats angewendet, ist jedoch nicht sequenzspezifisch.

7.5.3 Real-time-PCR-Amplifikationskurven

Real-time-PCR-Amplifikationskurven sollte durch Sichtprüfung auf eine sigmoidale Form überprüft werden, um Artefakte/falsch-positive Ergebnisse auszuschließen.

ANMERKUNG Die Schmelzkurvenanalyse wird manchmal zur Verifizierung des Amplifikats angewendet, ist jedoch nicht sequenzspezifisch.

7.6 Angabe der Ergebnisse

7.6.1 Angabe der positiven Ergebnisse

Die Ergebnisse müssen so beschrieben werden, dass sie den Nachweis der von dem Target stammenden DNA aufzeigen.

BEISPIEL Für den Zielanalyten X wurde das Vorhandensein von DNA nachgewiesen, die von (spezifische Zielsequenz und Tierart oder taxonomische Gruppe angeben) stammt.

ANMERKUNG Der Anwendungsbereich dieser Analyse besteht nur darin, das Vorhandensein/Nichtvorhandensein von DNA der genannten Tierart nachzuweisen, nicht aber das Vorhandensein/Nichtvorhandensein von Gewebe der Tierart (z. B. DNA aus Ei, Gelatine).

Die Ergebnisse für alle Einwaagen einer Probe in einer Analyse müssen übereinstimmen. Liefert mindestens eine Einwaage ein positives Ergebnis und mindestens eine Einwaage ein negatives Ergebnis, muss die PCR-Analyse wiederholt werden.

Sind die PCR-Ergebnisse der zweiten Analyse nicht für alle Einwaagen identisch, müssen die DNA-Extraktion und die PCR-Analyse wiederholt werden.

Ergeben mindestens zwei Wiederholungen des Verfahrens (beginnend mit der DNA-Extraktion) uneindeutige Ergebnisse, z. B. ein positives und ein negatives Ergebnis, muss im Bericht angegeben werden, dass die Probe an der Nachweisgrenze negativ ist.

Das Ergebnis muss die Spezifität [Art oder taxonomische Gruppe(n)] und das Ziel (nukleär, mitochondrial oder andere) des Verfahrens angeben, um eine eindeutige Interpretation und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen.