

DIN EN ISO 22174



ICS 07.100.30

Entwurf

Einsprüche bis 2022-12-07
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 22174:2005-05,
DIN EN ISO 20837:2006-08,
DIN EN ISO 20838:2006-08 und
DIN EN ISO 22119:2011-11

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Mikroorganismen –
Allgemeine Anforderungen und Definitionen (ISO/DIS 22174:2022);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 22174:2022**

Microbiology of the food chain –
Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of microorganisms –
General requirements and definitions (ISO/DIS 22174:2022);
German and English version prEN ISO 22174:2022

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche et la quantification de
micro-organismes pathogènes dans les aliments –
Exigences générales et définitions (ISO/DIS 22174:2022);
Version allemande et anglaise prEN ISO 22174:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-10-07 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 59 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 22174:2022) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ 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/IEC 17025	siehe	DIN EN ISO/IEC 17025
ISO 835	siehe	DIN EN ISO 835
ISO 6887 (alle Teile)	siehe	DIN EN ISO 6887 (alle Teile)
ISO 7218	siehe	DIN EN ISO 7218
ISO 13843	siehe	DIN EN ISO 13843
ISO 15216-1	siehe	DIN EN ISO 15216-1
ISO 16140 (alle Teile)	siehe	DIN EN ISO 16140 (alle Teile)
ISO 16297*	siehe	DIN EN ISO 16297
ISO 20836	siehe	DIN EN ISO 20836
ISO 21187**	siehe	DIN EN ISO 21187
ISO 22118	siehe	DIN EN ISO 22118
ISO 24276	siehe	DIN EN ISO 24276
ISO/TS 13136	siehe	DIN CEN ISO/TS 13136, DIN SPEC 10794
ISO/TS 17919	siehe	DIN CEN ISO/TS 17919, DIN SPEC 10793

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 20837:2006-08, DIN EN ISO 20838:2006-08, DIN EN ISO 22119:2011-11 und DIN EN ISO 22174:2005-05 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- Aufnahme der Normen ISO 20837:2006, ISO 20838:2006 und ISO 22119;
- Aufnahme von Anforderungen für die Umsetzung digitaler PCR;
- Aufnahme von Anforderungen für die Überwachung des Laborablaufs, inklusive der Überwachung der Umgebung für PCR;

* Die zitierte Norm ISO 16297 wurde zurückgezogen. Die aktuelle Ausgabe ist ISO 16297, IDF 161.

** Die zitierte Norm ISO 21187 wurde zurückgezogen. Die aktuelle Ausgabe ist ISO 21187, IDF 196

- d) Änderung des Titels und Aufnahme von Unterabschnitt 12.5 um Quantifikation aufzunehmen;
- e) Aufnahme eines neuen Abschnitts über Validierung und Verifizierung;
- f) Aufnahme von Verfahren aus dem Bereich Mikrobiologie der Lebensmittelkette die PCR verwenden in den Literaturhinweisen zur Information.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TS 13136, DIN SPEC 10794, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Horizontales Verfahren für den Nachweis von Shiga-Toxin bildenden Escherichia coli (STEC) und Bestimmung der Serogruppen O157, O111, O26, O103 und O145*

DIN CEN ISO/TS 17919, DIN SPEC 10793, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Nachweis von Botulinum-Neurotoxin Typ A, B, E und F produzierenden Clostridien*

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

DIN EN ISO 835, *Laborgeräte aus Glas — Messpipetten*

DIN EN ISO 6887 (alle Teile), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen*

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

DIN EN ISO 13843, *Wasserbeschaffenheit — Anforderungen zur Bestimmung von Leistungsmerkmalen von quantitativen mikrobiologischen Verfahren*

DIN EN ISO 15216-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zur Bestimmung von Hepatitis-A-Virus und Norovirus mittels Real-time-RT-PCR*

DIN EN ISO 16140 (alle Teile), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung*

DIN EN ISO 16297, *Milch — Bestimmung der Gesamtkeimzahl — Protokoll für die Bewertung alternativer Verfahren*

DIN EN ISO 20836, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Mikroorganismen — Temperaturleistungsprüfung für Thermocycler*

DIN EN ISO 21187, *Milch — Quantitative Bestimmung der mikrobiologischen Qualität — Leitfaden für die Erarbeitung und Verifizierung einer Übertragungsbeziehung zwischen den Ergebnissen von einem alternativen und einem Bezugsverfahren*

DIN EN ISO 22118, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Leistungsmerkmale*

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

Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von Mikroorganismen – Allgemeine Anforderungen und Definitionen (ISO/DIS 22174:2022)

Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of micro-organisms – General requirements and definitions (ISO/DIS 22174:2022)

Microbiologie de la chaîne alimentaire – Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la recherche et la quantification de micro-organismes pathogènes dans les aliments – Exigences générales et définitions (ISO/DIS 22174:2022)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Kurzbeschreibung	15
4.1 Allgemeines	15
4.2 Untersuchungsmaterial	16
4.3 Probenahme, Transport und Lagerung	16
4.4 Herstellung der Untersuchungsprobe	16
5 Mikrobielle Anreicherung und Viruskonzentrierung	16
5.1 Mikrobielle Anreicherung	16
5.2 Viruskonzentrierung	16
6 Nukleinsäureaufbereitung	16
6.1 Allgemeines	16
6.2 Entfernung von DNA aus toten Zellen	17
6.3 Nukleinsäureextraktion, -freisetzung und -reinigung	17
6.4 Qualität und Quantität der Nukleinsäuren	17
7 PCR-Amplifikation	18
8 Nachweis und Bestätigung von PCR-Produkten	18
9 Allgemeine Anforderungen an die Laborumgebung	19
9.1 Allgemeines	19
9.2 Laboreinrichtung	19
9.2.1 Allgemeines	19
9.2.2 Steuerung der Ströme und Abläufe	21
9.2.3 Reinigung des Laboratoriums	21
9.2.4 Umgebungsüberwachung für die PCR	21
10 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	22
11 Ausrüstung	22
11.1 Allgemeines	22
11.2 Spezielle Ausrüstung für die PCR	22
12 Durchführung	23
12.1 Anreicherung und Probenaufbereitung	23
12.2 Amplifikation	24
12.2.1 Allgemeines	24
12.2.2 Kontrollreaktion	24
12.2.3 Nachweis von Amplikons	24
12.2.4 Datenanalyse	24
12.3 Auswertung	25
12.3.1 Qualitative Auswertung	25
12.3.2 Quantitative Auswertung	25
12.4 Untersuchungsbericht	26
13 Leistungsmerkmale von auf PCR beruhenden Verfahren	27
14 Validierung und Verifizierung von auf PCR beruhenden Verfahren	27
14.1 Allgemeines	27
14.2 Validierung	27
14.3 Verifizierung	27
Literaturhinweise	29

Bilder

Bild 1 — Flussdiagramm zur empfohlenen Nutzung von Einrichtungen für die manuelle Handhabung von PCR	20
---	-----------

Tabellen

Tabelle 1 — Kontrollen für die auf PCR beruhende Analyse	24
Tabelle 2 — PCR-Ergebnisse	25

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 22174:2022) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 22174:2005 ersetzen.

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.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 22174:2022 wurde von CEN als prEN ISO 22174:2022 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

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 9, *Microbiology*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 463, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 22174:2005), die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- die Normen ISO 20837:2006, ISO 20838:2006 und ISO 22119 wurden eingebunden;
- Anforderungen an die Anwendung digitaler PCR wurden aufgenommen;
- Anforderungen an die Überwachung der Abläufe im Laboratorium einschließlich der Umgebungsüberwachung für die PCR wurden aufgenommen;
- der Titel wurde geändert und 12.5 eingefügt, um die Quantifizierung aufzunehmen;
- ein neuer Abschnitt zu Validierung und Verifizierung wurde eingefügt;
- Verfahren aus der Mikrobiologie der Lebensmittelkette, die PCR verwenden, wurden zu Informationszwecken in die Literaturhinweise aufgenommen;

- Entwurf -

E DIN EN ISO 22174:2022-11
prEN ISO 22174:2022 (D)

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.

Einleitung

Aufgrund der großen Vielfalt an Lebensmittel- und Futtermittelprodukten kann es sein, dass dieses horizontale Verfahren bei bestimmten Produkten nicht in allen Einzelheiten geeignet ist. In diesem Fall dürfen andere Verfahren, die spezifisch für diese Produkte sind, angewendet werden, sofern dies aus berechtigten technischen Gründen absolut erforderlich ist. Nichtsdestotrotz sollte alles versucht werden, dieses horizontale Verfahren so weit wie möglich anzuwenden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt die allgemeinen Anforderungen an die *in-vitro*-Vervielfältigung (Amplifikation) von Nukleinsäuresequenzen (DNA oder RNA) fest. Es gilt für die Untersuchung auf Mikroorganismen und Viren aus der Lebensmittelkette unter Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR).

Die in diesem Dokument festgelegten Mindestanforderungen dienen dazu, vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse in verschiedenen Laboratorien sicherzustellen.

Dieses Dokument wurde für Mikroorganismen aus der Lebensmittelkette erstellt und ist anwendbar auf

- Produkte, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind,
- Produkte für das Füttern von Tieren,
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und Handhabung von Lebensmitteln und Futtermitteln,
- Proben aus dem Bereich der Primärproduktion.

Die Validierung alternativer Verfahren, die Einzel-Labor-Validierung und die Ringversuch-Validierung von nicht urheberrechtlich geschützten oder alternativen Bestätigungsverfahren werden nicht von diesem Dokument abgedeckt. Diese Aspekte im Rahmen der Mikrobiologie der Lebensmittelkette werden von der Normenreihe ISO 16140 abgedeckt.

2 Normative Verweisungen

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

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

ISO 20836, *Microbiology of the food chain — Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of microorganisms — Thermal performance testing of thermal cyclers*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 3534-1, ISO 5725-1 und ISO 16140-1 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 <https://www.electropedia.org/>

3.1

Annealing

Paarung komplementärer Einzelstränge von Nukleinsäuren zur Bildung eines doppelsträngigen Moleküls

3.2

Hintergrundfluoreszenz

„Hintergrundrauschen“

intrinsische Stärke der Fluoreszenz, die auf die verwendeten Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte zurückzuführen ist

3.3

Bestätigung eines PCR-Produkts

Prozess, der nachweist, dass das PCR-Produkt auf die Zielsequenz zurückgeht

3.4

Denaturierung

Prozess, der zur Auftrennung der doppelsträngigen Nukleinsäure in einzelsträngige Nukleinsäure führt

3.5

Desoxyribonukleosidtriphosphat

dNTP

Lösung, die dATP, dCTP, dGTP, dTTP und/oder dUTP enthält

3.6

Nachweis

Erkennen des Vorhandenseins der Zielnukleinsäure

3.7

Nachweis eines PCR-Produkts

Prozess, der die Anwesenheit eines PCR-Produkts erkennbar macht

3.8

digitale PCR

dPCR

Verfahren, bei dem Nukleinsäure-Vorlagen zufällig und unabhängig voneinander über mehrere Partitionen mit nominal gleichem Volumen verteilt werden, sodass einige Partitionen Vorlagen enthalten und andere nicht, und im Anschluss durch Amplifikation von Zielsequenzen mittels PCR und den Nachweis spezieller PCR-Produkte eine Zählung der Anzahl von Partitionen mit einem positiven und negativen Signal für die Zielvorlage erhalten wird

[QUELLE: ISO 20395:2019, 3.10, modifiziert — Anmerkung 1 zum Begriff und Anmerkung 2 zum Begriff wurden gestrichen.]

3.9

Desoxyribonukleinsäure

DNA, en: deoxyribonucleic acid

Polymer von Desoxyribonukleotiden, das in Doppelstrangform (dsDNA) oder in Einzelstrangform (ssDNA) vorkommt

3.10

DNA-Polymerase

thermostabiles Enzym, das die DNA-Synthese katalysiert

Anmerkung 1 zum Begriff: DNA-Polymerase kann auch ein hybridisiertes Nukleinsäure-Molekül mithilfe ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität hydrolisieren. Sie hängt von der Art des Enzyms ab und kann zum Beispiel bei Taq-, Tth- oder Tfl-Polymerase vorliegen.

3.11

DNA-Sonde

Nukleinsäuremolekül mit einer bestimmten Sequenz, das zum Nachweis der Ziel-DNA durch Hybridisierung verwendet wird

3.12

Ziel-Nukleinsäuresequenz

zur Amplifikation ausgewählte Nukleinsäuresequenz

3.13

endogene Sequenz

Nukleinsäuresequenz, die natürlicherweise in der untersuchten Matrix vorhanden ist

3.14

Endpunkt-PCR

Verfahren, bei dem die PCR-Amplifikation angewendet wird und nach Vollendung des PCR-Zyklus ein separater Nachweis der PCR-Produkte erfolgt

3.15

externe Amplifikationskontrolle

Kontroll-DNA oder -RNA, die in einer festgelegten Menge oder Anzahl an Kopien zu einem Aliquot der extrahierten Nukleinsäure hinzugefügt wird und als Kontrolle hinsichtlich der Amplifikation in einem getrennten Reaktionsansatz dient. Diese DNA- bzw. RNA-Sequenz kann endogen (natürlicherweise in der untersuchten Matrix vorhanden) oder exogen (natürlicherweise nicht in der untersuchten Matrix vorhanden) sein

3.16

exogene Sequenz

Nukleinsäuresequenz, die natürlicherweise nicht in der untersuchten Matrix vorhanden ist

3.17

Fluoreszenzsonde

Oligonukleotid oder Oligonukleotid-Analogon definierter Sequenz, das mit einem oder mehreren fluoreszierenden Molekül(en) gekoppelt ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Als Fluoreszenzsonde kann jegliches System verwendet werden, das ein Fluoreszenzsignal nach spezifischer Hybridisierung der Ziel-Nukleinsäuresequenz aussendet, das mit der spezifischen Ausrüstung nachgewiesen werden kann.

3.18

Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

FRET

abstandsabhängige Energieübertragung von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül, die zu einer verstärkten Fluoreszenz des Akzeptormoleküls nach Anregung mit elektromagnetischer Strahlung definierter Wellenlänge führt

3.19

Hot-start-PCR

Aktivierung einer thermostabilen DNA-Polymerase durch einen anfänglichen Erhitzungsschritt, um eine unspezifische Amplifikation zu unterdrücken

3.20

Hybridisierung

spezifische Bindung von komplementären Nukleinsäuresequenzen unter geeigneten Reaktionsbedingungen

3.21

Hybridisierungssonde

System, bestehend aus zwei Fluoreszenzsonden, die jeweils mit einem fluoreszierenden Molekül gekoppelt sind, von denen ein Molekül als FRET-Donor und das andere Molekül als FRET-Akzeptor dient

3.22

Hydrolysesonde

Fluoreszenzsonde, die mit einem Fluorophor und einem Quencher gekoppelt ist, die während des Amplifikationsprozesses durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität des Enzyms sterisch getrennt werden

3.23

interne Amplifikationskontrolle

DNA, die zu jeder Reaktion in einer festgelegten Menge oder Anzahl an Kopien hinzugefügt wird und die als interne Kontrolle hinsichtlich der Amplifikation dient. Diese DNA-Sequenz kann endogen (natürlicherweise in der untersuchten Matrix vorhanden) oder exogen (natürlicherweise nicht in der untersuchten Matrix vorhanden) sein

3.24

Laborprobe

Probe, die zum Versand an das Laboratorium vorbereitet wurde und zur Überprüfung und Untersuchung vorgesehen ist

[QUELLE: ISO 7002:1986, A.19]

3.25

Mastermix

Mischung von Reagenzien für die Nukleinsäuren-Amplifikation bei der PCR mit Ausnahme der Ziel-DNA/der Ziel-Nukleinsäuresequenz/der Nukleinsäure aus der Untersuchungsprobe

[QUELLE: ISO 17822-2:2020:2016, 3.27, modifiziert — Im Englischen wurde „DNA and the controls“ entfernt und durch „target nucleic acid sequencenucleic acid from the test sample“ („der Ziel-Nukleinsäuresequenz/der Nukleinsäure aus der Untersuchungsprobe“) ersetzt.]

3.26

Matrix

alle Komponenten der Probe

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.38, modifiziert — Bei der Benennung wurde „(Produkt)“ entfernt.]

3.27

Molecular Beacon

Fluoreszenzsonde, die aus folgenden drei Teilen besteht: einem mittleren Teil, der komplementär zur Nukleinsäure-Zielsequenz ist, sowie einem 5'-Teil und einem 3'-Teil, die zueinander komplementär sind; das Reportermolekül ist an einen Arm des Moleküls gebunden, während das Ende des anderen Arms einen Quencher trägt

3.28

multiplex PCR

PCR, die den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Ziele in einer einzigen Reaktion ermöglicht

3.29

negative Extraktionskontrolle

Extraktionsblindprobe

Kontrolle, mit der sämtliche Schritte der DNA- bzw. RNA-Extraktion ohne Zugabe der Untersuchungsprobe durchgeführt werden

3.30

negative PCR-Kontrolle

PCR-Kontrolle, die mit Wasser (oder einem anderen PCR-inerten Substrat wie etwa Zerkleinerungs- oder Elutionspuffer) durchgeführt wird, das keine Zielnukleinsäure und keine PCR-Inhibitoren enthält

3.31

negative Prozesskontrolle

Probe der Matrix ohne Zielsequenz, die sämtliche Stufen des analytischen Prozesses durchläuft

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Prozess umfasst Probenvorbereitung, Anreicherung, DNA- bzw. RNA-Extraktion und Amplifikation der Zielsequenz.

3.32

Nukleinsäure

Polymer von Desoxyribonukleotiden oder Ribonukleotiden

3.33

Nukleinsäure-Extraktion

Probenbehandlung zur Freisetzung der Zielnukleinsäure

3.34

Nukleinsäure-Reinigung

Verfahren zur Verringerung der Menge an Inhibitoren.

3.35

einstufige RT-PCR (en: one-step RT-PCR)

Verfahren, das die reverse Transkription (RT) von RNA in cDNA und die PCR in einem Reaktionsgefäß kombiniert

3.36

passive Referenz

fluoreszierende Moleküle, die in dem zum Normieren des Signals verwendeten Reaktionsgemisch vorliegen

3.37

PCR-Produkt

Amplikon

durch PCR vervielfältigte DNA

3.38

DNA von PCR-Qualität

DNA-Matrize von für die PCR geeigneter Länge, Reinheit und Menge

3.39

Polymerase-Kettenreaktion

PCR, en: polymerase chain reaction

enzymatische Reaktion, mit der eine *in-vitro*-Vervielfältigung (Amplifikation) von DNA durchgeführt werden kann

3.40

positive PCR-Kontrolle

Reaktion, die die Ziel-DNA oder -RNA in einer festgelegten Menge oder Anzahl an Kopien enthält

3.41

positive Prozesskontrolle

mit einem Mikroorganismus oder Virus beimpfte Probe, die in gleicher Weise wie die Untersuchungsproben behandelt werden sollte, um die Reaktion zu überwachen

3.42

Primer

Oligonukleotid einer definierten Länge und Sequenz, das komplementär zu einem Fragment der Ziel-Nukleinsäuresequenz ist

3.43

Primer-Extension

enzymatische Reaktion, die zur Synthese eines neuen DNA-Stranges durch schrittweise Addition von einzelnen Desoxyribonukleotiden an das 3'-Ende der Primersequenz führt

3.44

Quencher-Molekül

fluoreszierendes Molekül, das als Energieaufnehmer (Akzeptor) dient und somit das Fluoreszenzsignal des Reportermoleküls (Donors) unterdrückt

3.45

Real-time-PCR

Verfahren, bei dem die PCR-Amplifikation mit dem Nachweis und/oder der Quantifizierung spezifischer PCR-Produkte während des Amplifikationsprozesses kombiniert wird

3.46

Referenzmaterial

Material, das ausreichend homogen und bezüglich einer oder mehrerer bestimmter Eigenschaften stabil ist und von dem festgestellt wurde, dass es für seinen Verwendungszweck bei einer Messung geeignet ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Hersteller von Referenzmaterial, die die Anforderungen der ISO 17034 erfüllen, gelten als kompetent.

[QUELLE: ISO Guide 30:2015, 2.1.1, modifiziert — Die ursprünglichen Anmerkungen 1 bis 4 zum Begriff wurden gestrichen und eine neue Anmerkung 1 zum Begriff wurde hinzugefügt.]

3.47

Reportermolekül

fluoreszierendes Molekül, das zum Anzeigen der Hybridisierung bestimmter Sonden durch Anregung mit elektromagnetischer Strahlung geeigneter Wellenlänge verwendet wird

3.48

reverse Transkription

RT

Synthese von DNA aus einer RNA-Matrize unter Benutzung einer reversen Transkriptase (Enzym)

3.49

reverse Transkriptase

Enzym, das die reverse Transkription von RNA zu DNA katalysiert

3.50

Ribonuklease

RNase

Enzym, das die RNA abbaut/degradiert

3.51

Ribonuklease-Inhibitor

Substanz, die die Ribonuklease-Aktivität blockiert

3.52

Ribonukleinsäure

RNA

Polymer von Ribonukleotiden, das in Doppelstrangform oder in Einzelstrangform vorkommt

3.53

Reverse-Transkription-PCR

RT-PCR

Verfahren, bestehend aus zwei Reaktionen, einer reversen Transkription (RT) von RNA in DNA und einer anschließenden PCR

Anmerkung 1 zum Begriff: Eine einstufige RT-PCR wird in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt

Anmerkung 2 zum Begriff: Eine zweistufige RT-PCR kann entweder nacheinander in demselben Reaktionsgefäß oder in zwei getrennten Reaktionsgefäßen durchgeführt werden.

3.54

Spezifität

Eigenschaft eines Verfahrens, ausschließlich auf den untersuchten Analyten zu reagieren

[QUELLE: ISO 24276:2006, 3.1.4]

3.55

Untersuchungsprobe

aus der *Laborprobe* nach der im Untersuchungsverfahren festgelegten Verfahrensweise hergestellte Probe, von der *Prüfmengen* entnommen werden

3.56

Prüfmenge

aus der Laborprobe entnommene, abgemessene (Volumen oder Masse) repräsentative Probe

[QUELLE: 6887-1, 3.5, modifiziert — Der Bezug auf die Erstverdünnung und Anmerkung 1 zum Begriff wurden gestrichen.]

3.57

Thermocycler

Gerät, das festgelegte Erhitzungs- und Kühlzyklen automatisiert durchführen kann, die für eine PCR oder Real-time-PCR notwendig sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Beim Thermocycler kann es sich um einen blockbasierten Thermocycler oder einen Thermocycler mit (individueller) Reaktionskammer handeln.

[QUELLE: ISO 20836:2021, 3.2.1]

3.58

Quantifizierungszyklus

C_q
 C_t
 C_p
TOP

der Zyklus bei der Real-time-PCR, bei dem das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden kann und der in die exponentielle Phase der Amplifikation der Zielsequenz übergeht

Anmerkung 1 zum Begriff: Quantifizierungszyklus ist ein allgemeiner Begriff, der die Begriffe Zyklusschwellenwert (C_t , en: cycle threshold), Kreuzungspunkt (C_p , en: crossing point), Übergangspunkt (TOP, en: take off point) und alle anderen gerätespezifischen Begriffe einschließt, die sich auf den Anteil der Zyklen beziehen, der zum Nachweis oder zur Quantifizierung der Zielsequenz bei der Real-time-PCR verwendet wird.

Anmerkung 2 zum Begriff: Der Quantifizierungszyklus basiert entweder auf einem Schwellenwert, der auf alle Proben angewendet wird, oder auf einer Regressionsanalyse des Signals für jede einzelne Probe.

[QUELLE: ISO 20395:2019, 3.8 — modifiziert]