

DIN EN ISO 15216-1:2017-07 (D)

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zur Bestimmung von Hepatitis-A-Virus und Norovirus mittels Real-time-RT-PCR - Teil 1:
Verfahren zur Quantifizierung (ISO 15216-1:2017); Deutsche Fassung EN ISO 15216-1:2017

| Inhalt | Seite |
|---|-------|
| Europäisches Vorwort..... | 4 |
| Vorwort..... | 5 |
| Einleitung..... | 6 |
| 1 Anwendungsbereich..... | 7 |
| 2 Normative Verweisungen..... | 7 |
| 3 Begriffe..... | 7 |
| 4 Kurzbeschreibung..... | 10 |
| 4.1 Virusgewinnung..... | 10 |
| 4.2 RNA-Extraktion..... | 10 |
| 4.3 Real-time-RT-PCR (Real-time-Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion)..... | 10 |
| 4.4 Kontrollmaterialien..... | 11 |
| 4.4.1 Prozesskontrollvirus..... | 11 |
| 4.4.2 Doppelsträngige DNA-Kontrolle (dsDNA-Kontrolle)..... | 11 |
| 4.4.3 EC-RNA-Kontrolle..... | 11 |
| 4.5 Untersuchungsergebnisse..... | 12 |
| 5 Reagenzien..... | 12 |
| 5.1 Allgemeines..... | 12 |
| 5.2 Reagenzien, die im Lieferzustand verwendet werden..... | 12 |
| 5.3 Herzustellende Reagenzien..... | 13 |
| 6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien..... | 14 |
| 7 Probenahme..... | 16 |
| 8 Durchführung..... | 16 |
| 8.1 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien..... | 16 |
| 8.2 Virusgewinnung..... | 16 |
| 8.2.1 Virusmaterial für die Prozesskontrolle..... | 16 |
| 8.2.2 Negative Prozesskontrolle..... | 16 |
| 8.2.3 Lebensmitteloberflächen..... | 17 |
| 8.2.4 Weiches Obst, Blatt-, Stängel- und Zwiebelgemüse..... | 17 |
| 8.2.5 In Flaschen abgefülltes Trinkwasser..... | 18 |
| 8.2.6 Zweischalige Weichtiere (en: bivalve molluscan shellfish, BMS)..... | 19 |
| 8.3 RNA-Extraktion..... | 19 |
| 8.4 Real-time-RT-PCR..... | 20 |
| 8.4.1 Allgemeine Anforderungen..... | 20 |
| 8.4.2 Analyse mit Real-time-RT-PCR..... | 20 |
| 9 Auswertung der Ergebnisse..... | 23 |
| 9.1 Allgemeines..... | 23 |
| 9.2 Erstellen von Standardkurven..... | 23 |
| 9.3 Berechnung der RT-PCR-Inhibition..... | 23 |
| 9.4 Berechnung der Extraktionseffizienz..... | 24 |
| 9.5 Proben-Quantifizierung..... | 25 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 10 | Angabe der Ergebnisse | 26 |
| 11 | Präzision des Verfahrens..... | 27 |
| 11.1 | Ringversuch | 27 |
| 11.2 | Wiederholpräzision..... | 27 |
| 11.3 | Vergleichgrenze..... | 27 |
| 12 | Untersuchungsbericht..... | 28 |
| | Anhang A (normativ) Schematische Darstellung des Verfahrens | 29 |
| | Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung von Reagenzien und Pufferlösungen | 30 |
| | Anhang C (informativ) Real-time-RT-PCR-Mastermixe und Parameter für die Durchführung der PCR..... | 33 |
| | Anhang D (informativ) Real-time-RT-PCR-Primer und -Hydrolysesonden für den Nachweis von HAV, Norovirus GI und GII sowie Mengovirus (Prozesskontrolle)..... | 34 |
| | Anhang E (informativ) Vermehrung des Mengovirus-Stammes MC₀ zur Verwendung als Prozesskontrolle | 37 |
| | Anhang F (informativ) RNA-Extraktion unter Anwendung des NucliSENS®-Systems | 38 |
| | Anhang G (informativ) Herstellung der doppelsträngigen Kontroll-DNA-Stammlösungen..... | 40 |
| | Anhang H (informativ) Herstellung der EC-RNA-Stammlösungen..... | 43 |
| | Anhang I (informativ) Beispielhafte Plattenbelegung..... | 45 |
| | Anhang J (informativ) Untersuchungen zur Methodvalidierung und Leistungsmerkmale des Verfahrens..... | 46 |
| | Literaturhinweise | 57 |