DIN EN ISO 15216-2:2019-12 (D)

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Horizontales Verfahren zur Bestimmung von Hepatitis-A-Virus und Norovirus in Lebensmitteln mittels Real-time-RT-PCR - Teil 2: Nachweisverfahren (ISO 15216-2:2019); Deutsche Fassung EN ISO 15216-2:2019

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort 5
Vorwort 6
Einleitung 8
1 Anwendungsbereich 9
2 Normative Verweisungen 9
3 Begriffe 9
4 Kurzbeschreibung 11
4.1 Virusgewinnung 11
4.2 RNA-Extraktion 11
4.3 Real-time-RT-PCR (Real-time-Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion) 12
4.4 Kontrollmaterialien 12
4.4.1 Prozesskontrollvirus 12
4.4.2 EC-RNA-Kontrolle 12
4.5 Untersuchungsergebnisse 13
5 Reagenzien 13
5.1 Allgemeines 13
5.2 Reagenzien, die im Lieferzustand verwendet werden 13
5.3 Herzustellende Reagenzien 14
6 Ausrüstung und Verbrauchsmaterialien 15
7 Probenahme 17
8 Durchführung 17
8.1 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien 17
8.2 Virusgewinnung 17
8.2.1 Allgemeines 17
8.2.2 Virusmaterial für die Prozesskontrolle 17
8.2.3 Negative Prozesskontrolle 17
8.2.4 Oberflächen 17
8.2.5 Weiches Obst, Blatt-, Stängel- und Zwiebelgemüse 18
8.2.6 In Flaschen abgefülltes Trinkwasser 19
8.2.7 Zweischalige Weichtiere 19
8.3 RNA-Extraktion 20
8.4 Real-time-RT-PCR 20
8.4.1 Allgemeine Anforderungen 20
8.4.2 Analyse mit Real-time-RT-PCR 21
9 Auswertung der Ergebnisse 23
9.1 Allgemeines 23
9.2 Erstellen der Standardkurve für die Prozesskontrollvirus-RNA 23
9.3 Kontrolle auf Inhibition der RT-PCR 24
9.4 Berechnung der Extraktionseffizienz 24
10 Angabe der Ergebnisse 25

11 Leistungsmerkmale des Verfahrens 26
11.1 Validierungsstudie 26
11.2 Empfindlichkeit 26
11.3 Spezifität 26
11.4 LOD_{50} 26

12 Untersuchungsbericht 26

Anhang A (normativ) Schematische Darstellung des Verfahrens 27

Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung von Reagenzien und Pufferlösungen 28
B.1 5-fach konzentrierte PEG/NaCl-Lösung (500 g/l PEG 8 000, 1,5 mol/l NaCl) 28
B.1.1 Zusammensetzung 28
B.1.2 Herstellung 28
B.2 Chloroform/Butanol-Gemisch (Volumenanteile 1 : 1) 28
B.2.1 Zusammensetzung 28
B.2.2 Herstellung 28
B.3 Proteinase-K-Lösung (3 000 U/l) 28
B.3.1 Zusammensetzung 28
B.3.2 Herstellung 28
B.4 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, en: Phosphate-buffered saline) 29
B.4.1 Zusammensetzung 29
B.4.2 Herstellung 29
B.5 TRIS/Glycin/Rindfleischextrakt-Puffer (TGBE-Puffer; en: Tris/glycine/beef extract buffer) 29
B.5.1 Zusammensetzung 29
B.5.2 Herstellung 29
B.6 TRIS-Lösung (1 mol/l) 30
B.6.1 Zusammensetzung 30
B.6.2 Herstellung 30
B.7 EDTA-Lösung (0,5 mol/l) 30
B.7.1 Zusammensetzung 30
B.7.2 Herstellung 30
B.8 TRIS-EDTA-Puffer (TE-Puffer) (10 mmol/l TRIS, 1 mmol/l EDTA) 30
B.8.1 Zusammensetzung 30
B.8.2 Herstellung 30

Anhang C (informativ) Real-time-RT-PCR-Mastermixe und Parameter für die Durchführung der PCR 31

Anhang D (informativ) Real-time-RT-PCR-Primer und -Hydrolysesonden für den Nachweis des HAV, Norovirus GI und GII sowie Mengovirus (Prozesskontrolle) 32
D.1 HAV 32
D.2 Norovirus GI 32
D.3 Norovirus GII 33
D.4 Mengovirus 33

Anhang E (informativ) Vermehrung des Mengovirus-Stamms MC_0 zur Verwendung als Prozesskontrolle 35
E.1 Allgemeines 35
E.2 Reagenzien und Geräte 35
E.3 Durchführung 35

Anhang F (informativ) RNA-Extraktion unter Anwendung des BioMerieux NucliSens®-Systems 36
F.1 Reagenzien 36
F.2 Geräte 36
F.3 Durchführung 36

Anhang G (informativ) Herstellung von RNA-Stammlösungen für die Verwendung als externe Kontrolle (EC-RNA) 38
G.1 Allgemeines 38

G.2 Reagenzien und Geräte 39
G.3 Linearisierung von Plasmid-DNA 39
G.4 *In-vitro*-Transkription von RNA 39
G.5 Überprüfung auf Kontamination mit DNA 40
G.6 Quantitative Bestimmung der EC-RNA 40
Anhang H (informativ) Beispielhafte Plattenbelegung 41
Anhang I (informativ) Studien zur Validierung von Verfahren und Leistungsmerkmalen 42
Literaturhinweise 54