

# 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 <sub>50</sub> .....	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 <sub>0</sub> 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 <sup>®</sup> -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

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