

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	<i>In-vitro</i>-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