

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 Herstellende 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	LOD₅₀.....	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 MC₀ 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