E DIN EN ISO 25792:2027-01 (D/E)

Erscheinungsdatum: 2026-12-04

Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Nachweis des Hepatitis-E-Virus in Leber, Leberprodukten und Fleischerzeugnissen mittels real-time RT-PCR (ISO/DIS 25792:2026); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 25792:2026

Microbiology of the food chain - Detection of hepatitis E virus in liver, liver products, and meat products using real-time RT-PCR (ISO/DIS 25792:2026); German and English version prEN ISO 25792:2026

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort ... **8**

Vorwort ... **9**

Einleitung ... **10**

1 Anwendungsbereich ... **11**

2 Normative Verweisungen ... **11**

3 Begriffe ... **11**

4 Kurzbeschreibung ... **13**
4.1 Virusextraktion ... **14**
4.2 RNA-Extraktion ... **14**
4.3 Real-Time-PCR ... **14**
4.4 Kontrollmaterialien ... **14**
4.4.1 Virus für die interne Prozesskontrolle ... **14**
4.4.2 RNA für die Amplifikationskontrolle (AC-RNA) ... **15**
4.5 Untersuchungsergebnisse ... **15**

5 Reagenzien ... **15**
5.1 Allgemeines ... **15**
5.2 Reagenzien ... **15**
5.2.1 Wasser molekularbiologischer Qualität ... **15**
5.2.2 Extraktionsreagenz auf Basis von Guanidinthiocyanat und Phenol ... **15**
5.2.3 Chloroform ... **16**
5.2.4 Natriumchlorid (NaCl) ... **16**
5.2.5 Kaliumchlorid (KCl) ... **16**
5.2.6 Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) ... **16**
5.2.7 Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) ... **16**
5.2.8 TRIS-Base [Tris(hydroxymethyl)aminomethan] ... **16**
5.2.9 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ... **16**
5.2.10 Lysepuffer ... **16**
5.2.11 Magnetisches Siliciumdioxid, Lyse-, Wasch- und Elutionspuffer zur Extraktion der viralen RNA ... **16**
5.2.12 Siliciumdioxid-Spin-Säulen, Lyse-, Wasch- und Elutionspuffer zur Extraktion der viralen RNA ... **16**
5.2.13 Reagenzien für die One-Step-Real-Time-RT-PCR ... **16**
5.2.14 Primer und Hydrolysesonden für den Nachweis des HEV ... **17**
5.2.15 Primer und Hydrolysesonden für den Nachweis des Virus für die interne Prozesskontrolle ... **17**
5.3 Herzustellende Reagenzien ... **17**
5.3.1 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, en: phosphate-buffered saline) ... **17**
5.3.2 TRIS-EDTA-(TE-)Puffer ... **17**

5.3.3 Virusmaterial für die interne Prozesskontrolle ... 17
5.3.4 Real-Time-RT-PCR-Mastermixe für das HEV und das Virus für die interne Prozesskontrolle ... 17
5.3.5 RNA-Material für die Amplifikationskontrolle (AC-RNA-Material) ... 17

6 Geräte und Verbrauchsmaterialien ... 18
6.1 Mikropipetten und Pipettenspitzen ... 18
6.2 Pipettierhilfe und Pipetten ... 18
6.3 Vortex-Mischer ... 18
6.4 Keramikperlen ... 18
6.5 Mahlröhrchen mit Mahlmatrix ... 18
6.6 Scheren, Pinzetten und Rasierklingen ... 18
6.7 Stomacher-Filterbeutel ... 18
6.8 Stomacher-Gerät ... 18
6.9 Ansaugvorrichtung ... 18
6.10 Zentrifuge(n) und Rotor(en) ... 18
6.11 Zentrifugenröhrchen und -flaschen ... 19
6.12 Gerät für die RNA-Extraktion ... 19
6.13 Homogenisierungsgerät ... 19
6.14 Real-Time-PCR-Thermocycler ... 19
6.15 Verbrauchsmaterialien für die Real-Time-PCR ... 19

7 Probenahme ... 19

8 Herstellung der Untersuchungsprobe ... 19

9 Durchführung ... 20
9.1 Allgemeine Anforderungen an Labore ... 20
9.2 Virus- und RNA-Extraktion ... 20
9.3 Virusmaterial für die interne Prozesskontrolle ... 20
9.4 Negativprobe für die Prozesskontrolle ... 21
9.5 Fleischprodukte und Leberprodukte ... 21
9.6 Leberproben ... 22
9.7 Real-Time-PCR ... 22
9.7.1 Allgemeine Anforderungen ... 22
9.7.2 Real-Time-RT-PCR-Verfahren ... 23

10 Bewertung der Ergebnisse ... 25
10.1 Allgemeines ... 25
10.2 Erstellung der Standardkurve des Virus für die interne Prozesskontrolle ... 26
10.3 Kontrolle der RT-PCR-Hemmung ... 26
10.4 Berechnung der Extraktionseffizienz ... 26

11 Angabe der Ergebnisse ... 27

12 Validierung des Verfahrens ... 27
12.1 Ringversuch ... 27

13 Prüfbericht ... 28

14 Qualitätssicherung ... 28

Anhang A (normativ) Fließschema des Verfahrens ... 29

Anhang B (normativ) Zusammensetzung und Herstellung von Reagenzien und Pufferlösungen ... 30
B.1 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS, en: phosphate-buffered saline) ... 30
B.1.1 Zusammensetzung ... 30
B.1.2 Herstellung ... 30
B.2 TRIS-Lösung (1 mol/l) ... 30
B.2.1 Zusammensetzung ... 30
B.2.2 Herstellung ... 30
B.3 EDTA-Lösung (0,5 mol/l) ... 31
B.3.1 Zusammensetzung ... 31

B.3.2 Herstellung ... 31
B.4 TRIS-EDTA-Puffer (TE-Puffer) (10 mmol/l TRIS, 1 mmol/l EDTA) ... 31
B.4.1 Zusammensetzung ... 31
B.4.2 Herstellung ... 31

Anhang C (informativ) Real-Time-RT-PCR-Mastermixe für das HEV und Parameter für die Durchführung der PCR ... 32

Anhang D (informativ) Real-Time-RT-PCR-Primer und -Hydrolysesonden für den Nachweis des HEV ... 33

Anhang E (informativ) RT-PCR-Bedingungen, PCR-Primer und Hydrolysesonden für den Nachweis beispielhafter Viren für die interne Prozesskontrolle ... 34
E.1 Real-Time-RT-PCR-Primer und -Hydrolysesonden für den Nachweis des Bakteriophagen MS2 ... 34
E.2 Real-Time-RT-PCR-Primer und -Hydrolysesonden für den Nachweis des Mengovirus MC0 ... 35
E.3 Real-Time-RT-PCR-Primer und -Hydrolysesonde für den Nachweis des murinen Norovirus-1 ... 36

Anhang F (informativ) Beispiele für berichtete Werte der Extraktionseffizienz für bestimmte Kombinationen aus verschiedenen Matrices und Viren für die interne Prozesskontrolle ... 38

Anhang G (informativ) Kriterien für die Verwendung von AC-RNA ... 39
G.1 Allgemeines ... 39
G.2 Reagenzien und Geräte ... 39
G.2.1 Reagenzien für die In-vitro-Transkription der RNA (RNA-Polymerase, NTP, Puffer usw.). ... 39
G.2.2 RNase-freie DNase ... 39
G.2.3 Reagenzien für die Aufreinigung der RNA ... 39
G.2.4 Reagenzien und Ausrüstung für die One-Step-Real-Time-RT-PCR mit Hydrolysesonden ... 39
G.2.5 Brutschrank, der bei (37 ± 2) °C betrieben werden kann ... 39
G.3 *In-vitro*-Transkription der RNA ... 39
G.4 Überprüfung auf DNA-Kontamination ... 39
G.5 Quantitative Bestimmung der AC-RNA ... 40
G.6 Vorbereitung einer internen Amplifikationskontrolle ... 40

Anhang H (informativ) Beim Ringversuch zur Validierung angewendetes Verfahren für die Virus- und RNA-Extraktion aus Fleischprodukten und Leberprodukten ... 41
H.1 Spezifische Reagenzien (genauer spezifiziert in Ergänzung zu den Angaben in 5.2) ... 41
H.1.1 TRI®-Reagenz ... 41
H.1.2 NucliSens®-Lysepuffer ... 41
H.1.3 Magnetische Extraktionsreagenzien von NucliSens® ... 41
H.2 Geräte (in Ergänzung zu Abschnitt 6) ... 41
H.2.1 Magnetständer ... 41
H.2.2 Thermoschüttler ... 41
H.3 Virusextraktion ... 41
H.4 RNA-Extraktion ... 42

Anhang I (informativ) Beim Ringversuch zur Validierung angewendetes Verfahren für die Virus- und RNA-Extraktion aus Leberproben ... 43
I.1 Spezifische Reagenzien (genauer spezifiziert in Ergänzung zu den Angaben in 5.2) ... 43
I.1.1 Lysepuffer ... 43
I.1.2 Ethanol 70 % (v/v) ... 43
I.1.3 Wasch- und Elutionspuffer zur Extraktion der viralen RNA ... 43
I.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien (genauer spezifiziert in Ergänzung zu den Angaben in Abschnitt 6) ... 43
I.2.1 Keramikperlen ... 43
I.2.2 Homogenisierungsgerät ... 43
I.2.3 Mahlröhrchen mit Mahlmatrix ... 43
I.2.4 Siliciumdioxid-Spin-Säulen und Auffangröhrchen zur Extraktion der viralen RNA ... 43
I.3 Virusextraktion ... 43

I.4 RNA-Extraktion **44**

Anhang J (informativ) Verfahrensvalidierung und Leistungsmerkmale **45**
J.1 Verfahren für Leberprodukte **45**
J.2 Verfahren für Leber **46**

Literaturhinweise **48**

Tabellen

Tabelle B.1 ..... **30**

Tabelle B.2 ..... **30**

Tabelle B.3 ..... **31**

Tabelle B.4 ..... **31**

Tabelle C.1 — Mastermix **32**

Tabelle C.2 — Parameter für die Durchführung der PCR **32**

Tabelle D.1 — Hydrolysesonden für den Nachweis des HEV **33**

Tabelle E.1 — Mastermix für Real-Time-RT-PCR für den Bakteriophagen MS2 ..... **34**

Tabelle E.2 — Parameter für die Durchführung der Real-Time-RT-PCR für den Bakteriophagen MS2 ..... **34**

Tabelle E.3 — Primer und Hydrolysesonde für den Bakteriophagen MS2 ..... **35**

Tabelle E.4 — Mastermix für Real-Time-RT-PCR für das Mengovirus MC0 ..... **35**

Tabelle E.5 — Parameter für die Durchführung der Real-Time-RT-PCR für das Mengovirus MC0 ..... **36**

Tabelle E.6 — Primer und Hydrolysesonde für das Mengovirus MC0 ..... **36**

Tabelle E.7 — Mastermix für Real-Time-RT-PCR für das murine Norovirus-1 ..... **36**

Tabelle E.8 — Parameter für die Durchführung der Real-Time-RT-PCR für das murine Norovirus-1 ..... **37**

Tabelle E.9 — Primer und Hydrolysesonde für das murine Norovirus-1 ..... **37**

Tabelle F.1 ..... **38**

Tabelle J.1 — Ergebnisse der Datenanalyse aus Untersuchungen mit HEV in Fleischprodukten und Leberprodukten [9] **45**

Tabelle J.2 ..... **46**