

DIN EN ISO 20813



ICS 67.050

**Untersuchung auf molekulare Biomarker –
Verfahren zur Identifizierung und zum Nachweis von Tierarten in
Lebensmitteln (Nukleinsäureverfahren) –
Allgemeine Anforderungen und Definitionen (ISO 20813:2019);
Deutsche Fassung EN ISO 20813:2022**

Molecular biomarker analysis –
Methods of analysis for the detection and identification of animal species in foods and food
products (nucleic acid-based methods) –
General requirements and definitions (ISO 20813:2019);
German version EN ISO 20813:2022

Analyse moléculaire de biomarqueurs –
Méthodes d'analyse pour la détection et l'identification des espèces animales dans les
aliments et les produits alimentaires (méthodes basées sur l'utilisation des acides
nucléiques) –
Exigences générales et définitions (ISO 20813:2019);
Version allemande EN ISO 20813:2022

Gesamtumfang 39 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 20813:2019 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 20813:2022 durch das Technische Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ übernommen, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 057-08-02-02 AK „Molekularbiologische Speziesanalytik“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 5725-1:1994	siehe	DIN ISO 5725-1:1997-11
ISO 17034	siehe	DIN EN ISO 17034
ISO 21569	siehe	DIN EN ISO 21569
ISO 21571:2005	siehe	DIN EN ISO 21571:2013-08
ISO 24276	siehe	DIN EN ISO 24276
ISO/IEC 17025	siehe	DIN EN ISO/IEC 17025

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 17034, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Referenzmaterialherstellern*

DIN EN ISO 21569, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Qualitative auf Nukleinsäuren basierende Verfahren*

DIN EN ISO 21571:2013-08, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Nukleinsäureextraktion (ISO 21571:2005 + Amd 1:2013); Deutsche Fassung EN ISO 21571:2005 + A1:2013*

DIN EN ISO 24276, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Allgemeine Anforderungen und Definitionen*

DIN EN ISO/IEC 17025, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*

DIN ISO 5725-1:1997-11, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe (ISO 5725-1:1994)*

– Leerseite –

Deutsche Fassung

Untersuchung auf molekulare Biomarker —
Verfahren zur Identifizierung und zum Nachweis von
Tierarten in Lebensmitteln (Nukleinsäureverfahren) —
Allgemeine Anforderungen und Definitionen
(ISO 20813:2019)

Molecular biomarker analysis —
Methods of analysis for the detection and identification
of animal species in foods and food products (nucleic
acid-based methods) —
General requirements and definitions (ISO 20813:2019)

Analyse moléculaire de biomarqueurs —
Méthodes d'analyse pour la détection et l'identification
des espèces animales dans les aliments et les produits
alimentaires (méthodes basées sur l'utilisation des
acides nucléiques) —
Exigences générales et définitions (ISO 20813:2019)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 18. Dezember 2022 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Leistungsmerkmale der Verfahren	7
4.1 Allgemeines	7
4.2 Anwendungsbereich des Verfahrens	7
4.3 Wissenschaftliche Grundlage	7
4.4 Maßeinheiten	7
4.5 Anwendbarkeit	7
4.6 Spezifität	8
4.6.1 Allgemeines	8
4.6.2 Anforderungen an die Prüfung der Inklusivität	8
4.6.3 Anforderungen an die Prüfung der Exklusivität	9
4.7 Empfindlichkeit	9
4.7.1 Allgemeines	9
4.7.2 Nachweisgrenze (LOD)	9
4.8 Spezifische Anforderungen an quantitative Verfahren	10
4.8.1 Allgemeines	10
4.8.2 Bestimmungsgrenze (LOQ)	10
4.8.3 Dynamischer Bereich	11
4.8.4 Bestimmung von Präzision und Richtigkeit bei quantitativen Verfahren	11
4.9 Robustheit	11
4.9.1 Allgemeines	11
4.9.2 Bestimmung der Robustheit durch eine Laborvergleichsuntersuchung	12
4.9.3 Bestimmung der Robustheit durch einen mehrfaktoriellen orthogonalen Versuchsplan	12
5 Einzellaborvalidierung	12
6 Ringversuch	12
6.1 Allgemeines	12
6.2 Qualitative Verfahren	12
6.3 Quantitative Verfahren	13
7 Allgemeine Anforderungen an Labor und Durchführung	13
7.1 Allgemeines	13
7.2 Einrichtungen, Materialien und Ausstattung	13
7.3 Probenvorbereitung und DNA-Extraktion	14
7.4 Einsatz von Kontrollen	14
7.5 Datenanalyse	16
7.5.1 Kontrolle	16
7.5.2 Konventionelle PCR	16
7.5.3 Real-time-PCR-Amplifikationskurven	16
7.6 Angabe der Ergebnisse	16
7.6.1 Angabe der positiven Ergebnisse	16
7.6.2 Angabe der negativen Ergebnisse	17
7.6.3 Angabe der quantitativen Ergebnisse	17
8 Untersuchungsbericht	17
Anhang A (informativ) Liste typischer, für die Untersuchung der Inklusivität und Exklusivität verwendeter Arten	19
Anhang B (informativ) Beispiele für Umrechnungsverfahren von DNA-Kopienzahlen in Massenanteil	25
B.1 Allgemeines	25

B.2	Beispiel für die Umrechnung von Messergebnissen, die als Verhältnis der DNA-Kopienzahlen angegeben sind, in den Massenanteil unter Verwendung von Referenzmaterialien	25
B.3	Beispiel einer relativen quantitativen Bestimmung des Gehalts an Tierarten in Fleischerzeugnissen	26
B.3.1	Als Massenanteil angegebene Analysenergebnisse	26
B.3.2	Umrechnung von Messergebnissen, die als Kopienzahl je haploidem Genomäquivalent (cp/HGE) angegeben sind, in Massenanteil	26
B.4	Beispiel für die Berechnung mit der Kopienzahl von Single-copy-Genen	33
	Literaturhinweise	34

Bilder

Bild B.1	— Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten zur Messung des in einer Probe vorhandenen Gehalts an tierischen Bestandteilen	27
----------	---	----

Tabellen

Tabelle 1	— Fließdiagramm mit Schnittstellen aufeinanderfolgender Schritte und Kontrollen . .	15
Tabelle A.1	— Beispiele relevanter Säugetiere	19
Tabelle A.2	— Beispiele relevanter Vögel	20
Tabelle A.3	— Beispiele relevanter Reptilien	20
Tabelle A.4	— Beispiele relevanter Amphibien	20
Tabelle A.5	— Beispiele relevanter Fische	21
Tabelle A.6	— Beispiele relevanter Weichtiere	22
Tabelle A.7	— Beispiele relevanter Schalentiere	22
Tabelle A.8	— Beispiele relevanter Insekten	23
Tabelle B.1	— Real-time-PCR-basierte Quantifizierungsstrategie	28
Tabelle B.2	— Genomgrößen zur Berechnung der Genomkopien	29
Tabelle B.3	— Herstellung von Kalibrierstandards	32

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 20813:2019 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und als EN ISO 20813:2022 durch das Technische Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ übernommen, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Juni 2023, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 2023 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 20813:2019 wurde von CEN als EN ISO 20813:2022 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 16, *Horizontal methods for molecular biomarker analysis* erarbeitet.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt die Mindestanforderungen an die Leistungsmerkmale für den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen (DNA) durch molekulare Verfahren, wie z.B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), einschließlich verschiedener Post-PCR-Nachweisverfahren, Real-time-PCR, auf Einzel- und/oder Mehrfachsonden basierender Nachweisverfahren sowie der Kombination derartiger Verfahren, fest.

Das Dokument ist für den Nachweis, die Identifizierung und die quantitative Bestimmung von DNA von Tierarten höherer und niedrigerer taxonomischer Gruppen in Lebensmitteln sowie für die Validierung der entsprechenden Verfahren anwendbar.

Es ist für Säugetiere, Vögel, Reptilien, Amphibien, Fische, Weichtiere, Schalentiere und Insekten geeignet. Jeweils typische Beispiele sind in Anhang A aufgeführt.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 16577, *Molecular biomarker analysis — Terms and definitions*

ISO 24276, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 16577, ISO 24276 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Basic Local Alignment Search Tool

BLAST

hinsichtlich der Geschwindigkeit optimierter Algorithmus zum Sequenzvergleich, der zum Durchsuchen von Sequenzdatenbanken nach optimalen lokalen Alignments mit einer Abfragesequenz genutzt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieser Algorithmus approximiert direkt Alignments, die ein Maß für die lokale Ähnlichkeit, den Punktwert für das Signalpaar mit maximalem Signal (MST; en: maximum signal pair) oder den Punktwert für ein Segmentpaar mit hohem Punktwert (HSP, en: high-scoring segment pair), optimieren.

Anmerkung 2 zum Begriff: Siehe Literaturhinweis [2].

Anmerkung 3 zum Begriff: BLASTn ist für den Vergleich von Nukleotidsequenzen anwendbar.

3.2

konventionelle Polymerase-Kettenreaktion

konventionelle PCR

PCR-Verfahren, das einen Post-PCR-Schritt, wie z. B. Gelelektrophorese, zum Nachweis oder zur Sichtbarmachung von Amplifikationsprodukten erfordert, um ein qualitatives Ergebnis zu erhalten

4 Leistungsmerkmale der Verfahren

4.1 Allgemeines

Verfahren, die zur Analyse von Tierarten angewendet werden, müssen die Leistungsmerkmale nach diesem Dokument erfüllen. Die Ergebnisse aller Ringversuchs- und/oder Einzellaborvalidierungen und die Leistungsmerkmale müssen beschrieben werden.

ANMERKUNG Bezüglich der Umsetzung von Verfahren stehen einige Leitlinien zur Verfügung, siehe Literaturhinweis [10].

4.2 Anwendungsbereich des Verfahrens

Informationen bezüglich der vorgesehenen Anwendung und der Einschränkungen der Verfahren müssen bereitgestellt werden. Insbesondere müssen die Informationen darauf hinweisen, dass die in diesem Dokument festgelegten Kriterien erfüllt wurden.

4.3 Wissenschaftliche Grundlage

Ein Überblick über die Grundsätze und Verweisungen auf relevante wissenschaftliche Veröffentlichungen sollte zur Verfügung gestellt werden.

4.4 Maßeinheiten

Qualitative Analysen zeigen für eine bestimmte Zielsequenz (Target) an, ob sie nachweisbar oder nicht nachweisbar ist.

Bei quantitativen Analysen wird der gemessene Wert als Verhältnis der Kopienzahlen der DNA (c/c) berechnet. Mögliche Einflussfaktoren, einschließlich der Anzahl der DNA-Kopien der Zielsequenz im Genom sollten in Betracht gezogen werden. Andere Einheiten (z. B. Verhältnis der Massen) können verwendet werden. Die Grundsätze für die Berechnung des Verhältnisses müssen angegeben werden.

Soll mit einer quantitativen Methode das Masse/Masse-Verhältnis der Bestandteile verschiedener Tierarten in einer Probe beurteilt werden, so sollte darauf hingewiesen werden, dass die für das DNA-Kopienverhältnis gemessenen Werte nicht in allen Fällen das Masse/Masse-Verhältnis der tierischen Bestandteile in der Probe wiedergeben können.

4.5 Anwendbarkeit

Bei der Beurteilung, ob ein Verfahren geeignet ist, sollten die folgenden Aspekte in Bezug auf die Beschaffenheit der Zielsequenz berücksichtigt werden:

- das Zellkompartiment der Zielsequenz (nukleär oder mitochondrial);
- die Kopienzahl je Zelle;
- die Länge der Zielsequenz.

Bei quantitativen, speziesspezifischen Verfahren muss ein Zellkerngen, nicht mitochondriale DNA, als Zielsequenz verwendet werden. Die Zielsequenz muss als Einzelkopie im haploiden Genom vorliegen oder die Kopienzahl muss bestimmt werden/bekannt sein.

Bei der Beurteilung, ob ein Verfahren geeignet ist, sollten die folgenden Aspekte in Bezug auf die Matrix berücksichtigt werden:

- die Beschaffenheit der potenziellen Probenmatrices;

- der Grad der Verarbeitung der Probenbestandteile;
- die verschiedenen vorliegenden Spezies und tierischen Gewebetypen;
- die Vorbereitung der Probenmatrix.

Die Anwendbarkeit des Verfahrens muss durch DNA-Extraktion aus Vergleichsproben, die die Matrices und den Analyseumfang widerspiegeln, geprüft werden.

Die DNA sollte aus mindestens drei der für den Anwendungsbereich des Verfahrens relevantesten Matrices extrahiert werden. Die Vergleichsproben sollten definierte Massenanteile der Zieltierarten (gleichmäßig über den prozentualen dynamischen Bereich des Verfahrens verteilt) sowie für die Anwendung relevante Gewebe enthalten.

ANMERKUNG 1 Mitochondriale PCR-Zielsequenzen können nicht für eine zuverlässige quantitative Bestimmung der Anteile haploider Genomkopien verschiedener Spezies verwendet werden, weil sich die Anzahl mitochondrialer Zielsequenzen in Abhängigkeit vom Gewebetyp unterscheidet.

ANMERKUNG 2 Verschiedene tierische Gewebetypen können unterschiedliche DNA-Gehalte je Massenäquivalent enthalten.

ANMERKUNG 3 Die praktische Nachweisgrenze (LOD) (siehe ISO 21569) kann sich für verschiedene Matrices signifikant unterscheiden. Darüber hinaus tragen unterschiedliche Verarbeitungsgrade von tierischen Bestandteilen in ein und demselben Produkt zum DNA-Abbau und einer möglichen asymmetrischen DNA-Verteilung zwischen den Bestandteilen bei. Zum Beispiel kann ein Produkt aus verschiedenen tierischen Gewebearten bestehen, die unterschiedliche Mengen an DNA enthalten. Dieses Ungleichgewicht kann noch verstärkt werden, wenn einige Inhaltsstoffe vorverarbeitet wurden, z. B. durch Kochen oder Säurebehandlung, wodurch sich die DNA-Qualität verschlechtert, während andere Inhaltsstoffe zum Beispiel roh hinzugefügt oder anders verarbeitet wurden.

4.6 Spezifität

4.6.1 Allgemeines

Die Spezifität sollte in einem zweistufigen Verfahren beurteilt werden: theoretische und experimentelle Bewertung der Inklusivität und Exklusivität.

Es muss eine *In-silico*-Untersuchung der Spezifität von Primern und Sonden mit verfügbaren bioinformatischen Werkzeugen durchgeführt werden.

ANMERKUNG 1 Beispiele sind die Prüfung der Bildung von Primer-Dimeren mit primer3 [1] und BLAST [2]-Recherchen in Nukleinsäuresequenzdatenbanken.

Wenn Sequenzdaten für die Verifizierung von Tierartbestimmungen verwendet werden, sollten sie auf geeigneten Datenbanken beruhen, wobei der Zeitpunkt der Einreichung der einzelnen Einträge und alle späteren Änderungen der taxonomischen Klassifikation oder Benennung zu berücksichtigen sind.

ANMERKUNG 2 Bei unerwarteten Ergebnissen können weitere Untersuchungen mit geeigneten Techniken, wie z. B. Sequenzierung, Gelelektrophorese oder Hybridisierungsverfahren, durchgeführt werden, um die Identität des Referenzmaterials zu bestätigen.

4.6.2 Anforderungen an die Prüfung der Inklusivität

Es sollten experimentelle Ergebnisse der Prüfung des Verfahrens in Hinblick auf die Zieltierarten bereitgestellt werden. Diese Untersuchung sollte relevante Populationen beziehungsweise Rassen entsprechend dem Anwendungsbereich des Verfahrens (siehe 4.2) einschließen.