

DIN EN 15634-1

ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2018-06-20
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 15634-1:2009-04

Entwurf

**Lebensmittel –
Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen
Verfahren –
Teil 1: Allgemeine Betrachtungen;
Deutsche und Englische Fassung prEN 15634-1:2018**

Foodstuffs –

Detection of food allergens by molecular biological methods –

Part 1: General considerations;

German and English version prEN 15634-1:2018

Produits alimentaires –

Méthodes d'analyse molecularbiologique pour la détection des allergènes alimentaires –

Partie 1: Considérations générales;

Version allemande et anglaise prEN 15634-1:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-04-20 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 37 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15634-1:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-05 AA „Lebensmittelallergene“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 15634-1:2009-04 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Anpassung modaler Hilfsverben in allen Abschnitten;
- b) Umstrukturierung von 7.3 „Durchführung von PCR“;
- c) 10.4 und 10.5 wurden zusammengefasst.

Lebensmittel — Nachweis von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischen Verfahren — Teil 1: Allgemeine Betrachtungen

*Produits alimentaires — Méthodes d'analyse molecularbiologique pour la détection des allergènes alimentaires —
Partie 1 : Considérations générales*

Foodstuffs — Detection of food allergens by molecular biological methods — Part 1: General considerations

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
3.1 Begriffe in Bezug auf Extraktion und Reinigung von DNA	6
3.2 Begriffe in Bezug auf die Amplifikation von DNA	7
3.3 Begriffe in Bezug auf Kontrollen	7
4 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien	8
4.1 Allgemeines	8
4.2 Labororganisation	8
4.3 Geräte und Ausrüstungen	9
4.4 Material und Reagenzien	9
5 Durchführung	9
5.1 Kurzbeschreibung	9
5.2 Allgemeines	10
6 Isolierung/Extraktion von Nukleinsäuren	10
6.1 Probenvorbereitung	10
6.2 DNA-Extraktion	10
6.3 Quantitative Bestimmung der DNA	10
6.4 Qualität der DNA	10
6.5 Aufbewahrungsbedingungen für extrahierte DNA	11
7 Amplifikation von spezifischen Targetsequenzen	11
7.1 Reagenzien	11
7.2 Primer	12
7.2.1 Primerdesign	12
7.2.2 Forward und reverse Primer	12
7.2.3 Validierung von Primern	12
7.3 Durchführung von PCR	13
7.3.1 PCR Profil und Leistungskriterien	13
7.3.2 Beschreibung von PCR-Targets	13
7.3.3 Kontrollen	13
7.3.4 Amplifikation mittels PCR	14
8 Nachweis und Bestätigung von Amplifikaten	14
8.1 Allgemeines	14
8.2 Kalibrierung	14
8.3 Quantitative Bestimmung von Amplifikaten	15
9 Auswertung	15
10 Angabe der Ergebnisse	15
10.1 Allgemeines	15
10.2 Angabe eines positiven Ergebnisses	15
10.2.1 Qualitative PCR	15
10.2.2 Quantitative PCR	16

10.3	Angabe eines negativen Ergebnisses.....	16
10.4	Unklare Ergebnisse.....	16
11	Untersuchungsbericht.....	16
	Literaturhinweise.....	17

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15634-1:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 15634-1:2009 ersetzen.

Einleitung

Dieses Dokument beschreibt das Verfahren zum qualitativen Nachweis und/oder zur quantitativen Bestimmung von DNA als Marker für mögliche allergene Zutaten oder Bestandteile durch Analyse der aus der zu untersuchenden Probe extrahierten Nukleinsäuren.

Der qualitative Nachweis von DNA-Zielsequenzen (= Targetsequenzen) wird durchgeführt, um eine positive oder negative Antwort auf die Frage zu erhalten, ob eine bestimmte DNA-Sequenz, bezogen auf geeignete Kontrollen und innerhalb der Nachweisgrenzen des angewendeten analytischen Verfahrens und der analysierten Untersuchungsprobe nachgewiesen wurde oder nicht.

Der quantitative Nachweis von DNA-Zielsequenzen wird durchgeführt, um die Menge an DNA-Zielsequenzen, bezogen auf die Menge einer spezifischen Referenzsubstanz, von geeigneten Kalibriersubstanzen und Kontrollen und innerhalb des dynamischen Bereiches des angewendeten analytischen Verfahrens und der analysierten Untersuchungsprobe anzugeben. Geeignete Verfahren für die Extraktion von Nukleinsäuren sind in jedem Verfahren enthalten.

Der Schwerpunkt dieses Dokuments sind Amplifikationsverfahren auf der Grundlage der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Aufgrund der hohen Geschwindigkeit des technischen Wandels in diesem Bereich können jedoch auch andere Amplifikationstechniken und Nachweisverfahren in Betracht gezogen werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt den Gesamtrahmen für den Nachweis von Sequenzen, die Arten entsprechen, die Allergene enthalten, durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) fest. Er bezieht sich auf die Anforderungen an die spezifische Amplifikation von Target-Nukleinsäuresequenzen (DNA) und an die Bestätigung der Identität der amplifizierten Nukleinsäuresequenz.

Die in diesem Dokument angeführten Leitlinien, Mindestanforderungen und Leistungskriterien sind dafür vorgesehen, sicherzustellen, dass in verschiedenen Laboratorien vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden. Dieses Dokument wurde für Lebensmittelmatrixen erarbeitet.

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).

EN 15842:2010, *Lebensmittel — Nachweis von Lebensmittelallergenen — Allgemeine Betrachtungen und Validierung von Verfahren*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 15842:2010 und die folgenden Begriffe.

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

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

3.1 Begriffe in Bezug auf Extraktion und Reinigung von DNA

3.1.1

DNA-Extraktion

Trennung der DNA von den anderen Bestandteilen in einer Untersuchungsprobe

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Faktoren von besonderer Bedeutung in Bezug auf die isolierte DNA sind:

- a) Reinheit;
- b) Menge oder Konzentration; und
- c) Qualität (Unversehrtheit).

[QUELLE: EN ISO 24276:2006 und EN ISO 24276:2006/A1:2013, 3.2.1, modifiziert — Anmerkung hinzugefügt]

3.1.2

DNA-Reinigung

Verfahren, das zu einer höheren Reinheit der extrahierten DNA führt

Anmerkung 1 zum Begriff: In diesem Zusammenhang bezieht sich Reinheit auf das Verringern wahrnehmbarer und messbarer Auswirkungen von PCR-Inhibitoren.

[QUELLE: EN ISO 24276:2006 und EN ISO 24276:2006/A1:2013, 3.2.2, modifiziert — detailliertere Definition]

3.1.3

PCR-Qualität

eine DNA-Matrize von ausreichender Länge, chemischer Reinheit und struktureller Integrität für die Amplifikation durch PCR

[QUELLE: ISO 16577:2016, 3.139, modifiziert — Satzbau verändert]

3.2 Begriffe in Bezug auf die Amplifikation von DNA

3.2.1

Art-(Klassen-/Ordnungs-/Familien-/Gattungs-)spezifische Zielsequenz

Sequenz, die für die Art oder höhere Taxa als spezifisch bekannt ist

3.2.2

Identifizierung von Nukleinsäuresequenzen

Identifizierung von (Amplifikat) durch Vergleich mit einem/einer Referenz-Nukleinsäurefragment/-sequenz

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Identifizierung von PCR-verstärkten DNA-Sequenzen ist möglich, z. B. durch Hybridisierung mit einer Sonde, übereinstimmende Profile von Restriktionsanalysen oder Anpassung übereinstimmender Nukleinsäuresequenzen durch Sequenzierung.

Anmerkung 2 zum Begriff: Bei einer Standard-PCR-Methode ist die Bestätigung der Identität der amplifizierten Zielsequenz durch eine der beiden Methoden nach Anmerkung 1 zwingend vorgeschrieben.

3.3 Begriffe in Bezug auf Kontrollen

3.3.1

positive DNA-Zielkontrolle

Referenz-DNA oder DNA, die aus einem zertifizierten Referenzmaterial oder einer bekannten Positivproben, die für die zu untersuchende Sequenz oder das zu untersuchende Target repräsentativ ist, extrahiert wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Kontrolle ist dafür vorgesehen, zu zeigen, wie das Analysenergebnis einer Untersuchungsprobe, die die zu untersuchende Sequenz enthält, aussehen würde.

[QUELLE: EN ISO 24276:2006 und EN ISO 24276:2006/A1:2013, 3.4.1, modifiziert — „Organismus“ durch „Target“ ersetzt, Anmerkung verändert.]

3.3.2

negative DNA-Zielkontrolle

Referenz-DNA oder DNA, die aus einem zertifizierten Referenzmaterial oder einer als negativ bekannten Probe extrahiert wurde, die die zu untersuchende Sequenz nicht enthält

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Kontrolle ist dafür vorgesehen, zu zeigen, wie das Analysenergebnis von Untersuchungsproben, die die zu untersuchende Sequenz nicht enthalten, aussehen würde.

[QUELLE: EN ISO 24276:2006 und EN ISO 24276:2006/A1:2013, 3.4.2, modifiziert — Anmerkung verändert.]

3.3.3

PCR-Inhibitionskontrolle

Kontrolle, die bekannte Mengen an positiver Matrizen-DNA enthält, die in derselben oder einer geringeren Menge hinzugefügt wurde wie die zu analysierende DNA zur Reaktion

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Kontrolle ermöglicht die Erkennung des Vorliegens von löslichen PCR-Inhibitoren, was besonders im Fall einer negativen Amplifikation und quantitativen PCR notwendig ist.

3.3.4

Amplifikations-Reagenzienkontrolle

Kontrolle, die außer der extrahierten Matrizen-DNA der Untersuchungsprobe sämtliche Reagenzien enthält

Anmerkung 1 zum Begriff: Anstelle der Matrizen-DNA wird ein entsprechendes Volumen nukleinsäurefreies Wasser zur Reaktion hinzugefügt.

Anmerkung 2 zum Begriff: Das verwendete Wasser sollte bidestilliert oder von gleichwertiger Qualität sein und keine DNA oder Nukleasen enthalten (Reinheitsgrad für die Molekularbiologie).

3.3.5

negative Extraktionskontrolle

Kontrolle, mit der sämtliche Extraktionsschritte ohne Zugabe der Untersuchungsprobe durchgeführt werden,

BEISPIEL indem die Untersuchungsprobe durch Wasser ersetzt wird

ANMERKUNG 1 Es dient dem Nachweis möglicher Kontaminationen von Nukleinsäure während der Extraktion.

ANMERKUNG 2 Das verwendete Wasser sollte bidestilliert oder von gleichwertiger Qualität sein und keine DNA oder Nukleasen enthalten (Reinheitsgrad für die Molekularbiologie).

[QUELLE: EN ISO 24276:2006 und EN ISO 24276:2006/A1:2013, 3.4.5, modifiziert — geringfügig verändert.]

3.3.6

positive Extraktionskontrolle

Kontrollprobe, die dem Nachweis dient, dass die Durchführung des Nukleinsäure-Extraktionsverfahrens so erfolgte, dass die Extraktion und nachfolgende Amplifikation der Target-Nukleinsäure möglich ist, d. h. durch Verwendung eines Probenmaterials, von dem bekannt ist, dass es die Target-Nukleinsäure enthält

Anmerkung 1 zum Begriff: Informationen über Kontrollen können der EN ISO 24276 und EN ISO 24276:2006/A1:2013 entnommen werden.

4 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien

4.1 Allgemeines

Eine Europäische Norm, die sich mit den allgemeinen Betrachtungen und Validierungskriterien für Verfahren befasst, wurde mit EN 15842:2010 aufgestellt.

4.2 Labororganisation

Die in Bezug auf Sicherheitsbestimmungen zutreffenden Anforderungen müssen eingehalten werden und die Empfehlungen des Herstellers zur Sicherheit sollten berücksichtigt werden.

Eine zufällige Kontamination mit DNA kann durch Staub oder die Ausbreitung von Aerosolen verursacht werden. Daher sollte die Organisation der Arbeitsbereiche im Laboratorium logischerweise:

- auf der systematischen Abgrenzung der methodisch aufeinander folgenden Arbeitsschritte, die an der Analyse beteiligt sind, basieren; und
- dem Prinzip einer „Einbahnstraße“ (en: forward flow) bei der Probenhandhabung folgen.

Mindestens drei getrennt gekennzeichnete Arbeitsbereiche mit eigener Geräteausrüstung sind erforderlich:

- a) ein Arbeitsbereich für die Extraktion der Nukleinsäure aus der Untersuchungsprobe (Probe);

- b) ein Arbeitsbereich für das Ansetzen von PC-/Amplifikationsreaktionen; und
- c) ein Arbeitsbereich für nachfolgende Verfahrensschritte, einschließlich der Analyse und Charakterisierung der amplifizierten DNA-Segmente.

Wenn Staubteilchen erzeugende Zerkleinerungsverfahren angewendet werden, müssen diese in einem abgegrenzten Arbeitsbereich durchgeführt werden.

Eine physikalische Trennung durch die Nutzung verschiedener Räume ist die wirksamste und zu bevorzugende Art, um abgegrenzte Arbeitsbereiche sicherzustellen, es dürfen jedoch auch andere physikalische oder biochemische Verfahren als Schutz vor Kontamination Anwendung finden, eine vergleichbare Wirksamkeit vorausgesetzt.

Mitarbeiter sollten in jedem zugeordneten Arbeitsbereich verschiedene Laborkittel tragen. Sie müssen außerdem Einmalhandschuhe tragen. Handschuhe und Laborkittel sollten in angemessenen Abständen gewechselt werden.

4.3 Geräte und Ausrüstungen

Im Laboratorium sollten ordnungsgemäß gewartete Ausrüstungen verwendet werden, die für das angewendete Verfahren geeignet sind, z. B. in Übereinstimmung mit den in EN ISO/IEC 17025 [3] dargelegten Anforderungen. Außer der laborüblichen Grundausrüstung werden zusätzliche Geräte in den spezifischen Verfahren beschrieben.

Geräte und Ausrüstungen sollten nach den Anweisungen des Herstellers gewartet werden. Kalibriersysteme sollten zur Verfügung stehen und eine Kalibrierung der Ausrüstung, die sich stark auf die erzeugten Daten auswirken kann, sollte routinemäßig nach Qualitätssicherungsprogrammen des Laboratoriums durchgeführt werden.

4.4 Material und Reagenzien

Falls nicht anders angegeben, werden für die Analyse nur analysenreine, für die Molekularbiologie geeignete Reagenzien verwendet, die keine DNA und DNAsen enthalten. Die Reagenzien und Lösungen sollten bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, wenn nicht anders festgelegt. PCR-Reagenzien sollten in Form von kleinen Aliquoten aufbewahrt werden, um das Risiko einer Verunreinigung auf ein Minimum zu verringern. Das verwendete Wasser muss bidestilliert oder von gleichwertiger Qualität sein und darf keine DNA oder Nukleasen enthalten (Reinheitsgrad für die Molekularbiologie). Falls nicht anders festgelegt, werden die Lösungen durch Lösen der entsprechenden Reagenzien in Wasser hergestellt und autoklaviert. Wenn das Autoklavieren nicht möglich ist, können Vorrichtungen für die Ultrafiltration angewendet werden.

Zur Vermeidung von Verunreinigungen sollten alle Geräte und die Teile der Ausrüstung, die mit den Proben in Kontakt kommen, sowie die Arbeitsflächen leicht zu reinigen und zu dekontaminieren sein. Die Reinigung der Arbeitsflächen und Dekontamination vor dem Gebrauch und zusätzlich, wenn ein Verdacht auf Kontamination besteht, wird empfohlen. In dem für PCR ausgerüsteten Bereich kann sterile Technik eingesetzt werden — puderfreie Handschuhe, sterilisierte Kunststoffgeräte, sterilisierte Glasgeräte, autoklavierte Reagenzien, Einmalgeräte aus Kunststoff, Aerosol-geschützte Pipettenspitzen können verwendet werden.

5 Durchführung

5.1 Kurzbeschreibung

Die qualitative Analyse umfasst die Extraktion und den spezifischen Nachweis von Ziel-Nukleinsäuresequenzen in der Untersuchungsprobe. Ein qualitatives Ergebnis muss eindeutig das Vorhandensein oder Fehlen des untersuchten Targets (Klasse, Ordnung, Familie, Gattung oder Art)

nachweisen, bezogen auf geeignete Kontrollen und innerhalb der Nachweisgrenzen des angewendeten analytischen Verfahrens und der analysierten Untersuchungsprobe.

Die quantitative Analyse schließt außerdem die quantitative Bestimmung von DNA-Zielsequenzen in der Untersuchungsprobe ein.

5.2 Allgemeines

Die Analyse von Lebensmittelallergenen mit molekularbiologischer Methodik umfasst im Allgemeinen die folgenden Schritte:

- die Isolierung (/Extraktion) von Nukleinsäuren;
- die Amplifikation und den Nachweis von spezifischen Zielsequenzen;
- die Bestätigung der Spezifität des amplifizierten Fragments; und
- die quantitative Bestimmung der amplifizierten Fragmente in Bezug auf Kalibriersubstanzen.

ANMERKUNG Im Fall von Real-Time-PCR-Analysen erfolgen Amplifikation, Nachweis und Bestätigung gleichzeitig.

6 Isolierung/Extraktion von Nukleinsäuren

6.1 Probenvorbereitung

Weitere Angaben sind in EN 15842 und in den entsprechenden Prüfvorschriften zu finden. Es wird empfohlen, dass von jeder Laborprobe zwei Untersuchungsproben erstellt werden.

6.2 DNA-Extraktion

Das Grundprinzip der DNA-Extraktion besteht in der Freisetzung der in der Matrix vorhandenen DNA und außerdem in der gleichzeitigen oder anschließenden Reinigung der DNA von Inhibitoren der Polymerase-Kettenreaktion. Die Extraktion/Reinigung der DNA ist in jedem Verfahren beschrieben, wobei die in jedem Verfahren angegebenen Matrixbeispiele zu berücksichtigen sind.

6.3 Quantitative Bestimmung der DNA

Sie darf entweder mit physikalischen (z. B. Messung der Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge), chemisch-physikalischen (z. B. durch Anwendung von Interkalations- oder Bindemitteln, die fluoreszierende Strahlung aussenden können), enzymatischen (z. B. Biolumineszenznachweis) Verfahren oder durch quantitative PCR erfolgen. Letzteres Verfahren ist besonders geeignet bei zusammengesetzten Matrices oder bei Proben mit einem geringen DNA-Gehalt oder solchen, deren DNA degradiert ist.

6.4 Qualität der DNA

Die sich ergebende DNA-Lösung muss für die anschließende Amplifikation und quantitative Bestimmung der Amplifikate rein genug und im Wesentlichen frei von PCR-Inhibitoren sein. Die Qualität der DNA-Extraktion und -reinigung muss im Fall von negativen PCR-Amplifikationen bei einer Probe kontrolliert werden. In diesem Fall muss eine PCR-Inhibitionskontrolle einbezogen werden.

Die Qualität und das Vorhandensein von extrahierter DNA müssen bei Anwendung eines gegebenen Verfahrens auf eine gegebene Matrix in Bezug auf die Amplifikation durch PCR wiederholbar und reproduzierbar sein. Insbesondere muss das angewendete Verfahren die Wiederauffindung von DNA-Fragmenten ermöglichen, die größer als die Amplifikate sind.