

DIN EN 17881

ICS 07.080; 67.020; 67.120.30

Einsprüche bis 2022-09-08

Entwurf**Lebensmittelauthentizität –
DNA-Barcoding von Muscheln und Muschelprodukten anhand eines
definierten mitochondrialen 16S rRNA-Genabschnittes;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17881:2022**

Food authenticity –

DNA barcoding of bivalves and products derived from bivalves using a defined
mitochondrial 16S rRNA gene segment;

German and English version prEN 17881:2022

Authenticité des aliments –

Codes-barres d'ADN de bivalves et de produits à base de bivalves à l'aide de segment de
gène mitochondriaux du 16S rRNA;

Version allemande et anglaise prEN 17881:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-07-08 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 oder Am DIN-Platz, 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 36 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17881:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitskreis NA 057-08-02-02 AK „Molekularbiologische Speziesanalytik“ 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.

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

**Lebensmittelauthentizität – DNA-Barcoding von Muscheln und Muschelprodukten
anhand eines definierten mitochondrialen 16S rRNA-Genabschnittes**

Food authenticity – DNA barcoding of bivalves and products derived from bivalves using a defined mitochondrial 16S rRNA gene segment

Authenticité des aliments – Codes-barres d'ADN de bivalves et de produits à base de bivalves à l'aide de segment de gène mitochondriaux du 16S rRNA

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	7
5 Chemikalien und Hilfsmittel	7
5.1 Allgemeines	7
5.2 PCR-Reagenzien	7
6 Prüfeinrichtung	8
7 Durchführung	8
7.1 Probenvorbereitung	8
7.2 DNA-Extraktion	8
7.3 PCR	8
7.3.1 Allgemeines	8
7.3.2 PCR-Ansatz	8
7.3.3 Temperatur-Zeit-Programm	9
7.3.4 PCR-Kontrollen	9
8 Bewertung	10
8.1 Bewertung der PCR-Produkte	10
8.2 Bewertung der PCR-Ergebnisse	10
8.3 Sequenzierung der PCR-Produkte	10
8.4 Bewertung der Sequenzdaten	11
8.5 Abgleich der Sequenz mit öffentlichen Datenbanken	11
8.5.1 Allgemeines	11
8.5.2 Sequenzvergleich von 16S rRNA-Gensequenzen mit GenBank	12
9 Interpretation von Ergebnissen der Datenbankabfrage	12
10 Validierungsstatus und Leistungskriterien	13
10.1 Ringversuch zur Identifizierung von Muschelspezies durch Analyse von 16S rRNA-Gensequenzen	13
11 Prüfbericht	14
Anhang A (informativ) Praktische Laborerfahrungen hinsichtlich der Amplifizierbarkeit von 16S rRNA-Gensegmenten der geprüften Muschelspezies	16
Literaturhinweise	17

Tabellen

Tabelle 1 — Oligonukleotide für die Amplifikation der 16S rRNA-Genregion [1] [2]	7
Tabelle 2 — Komponenten für die 16S rRNA-PCR	9
Tabelle 3 — Temperatur-Zeit-Programm für die 16S rRNA-PCR	9
Tabelle 4 — Validierungsdaten des Ringversuchs	13
Tabelle 5 — Auswertung der Ergebnisse des Ringversuchs in Abhängigkeit von den verschiedenen Muschelspezies	14
Tabelle A.1 — Praktische Laborerfahrungen	16

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17881:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Lebensmittelsicherheit ist ein Schwerpunkt des Verbraucherschutzes. In den letzten drei Jahrzehnten hat im Handel mit Lebensmitteln ein Globalisierungsprozess stattgefunden. Die Handelswege für Meeresfrüchte werden immer länger und komplexer, sodass für die Sicherstellung der Lebensmittelsicherheit zuverlässige Methoden zur Rückverfolgbarkeit benötigt werden. Die korrekte Kennzeichnung von Lebensmitteln ist sowohl Voraussetzung für sichere Meeresfrüchteprodukte und fairen Handel als auch für die weitestmögliche Einschränkung illegaler, ungemeldeter und unregulierter Fischerei (IUU-Fischerei). Meeresfrüchte werden zunehmend in Exportländern verarbeitet. Besonders Muscheln werden häufig ohne ihre Schalen verkauft. Dies macht die Identifizierung der Spezies anhand ihrer morphologischen Merkmale unmöglich.

Die Erarbeitung von einheitlichen und standardisierten Verfahrensvorschriften zur Authentifizierung von Muschelprodukten ist notwendig, um verlässliche Methoden für den Nachweis von potentiellern Lebensmittelbetrug („Food Fraud“) zu schaffen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt ein Verfahren für die Identifizierung von einzelnen Muscheln auf Gattungs- oder Speziesebene.

Die Identifizierung der Muschelspezies erfolgt durch PCR-Amplifikation eines Segments des mitochondrialen 16S rRNA-Gens [1] [2], gefolgt von der Sequenzierung der PCR-Produkte und einem anschließenden Datenbankabgleich der Sequenzen [5]. Diese Vorgehensweise ermöglicht die Identifizierung einer großen Anzahl kommerziell bedeutender Muschelspezies.

Dieses Verfahren wurde erfolgreich an rohen Muscheln validiert, Laborerfahrungen zeigen jedoch, dass dieses Verfahren auch an verarbeiteten Proben, wie z. B. kalt- und heißgeräucherten, gesalzenen, tiefgefrorenen, gekochten, gebratenen und frittierten Proben, angewendet werden kann.

Für die Untersuchung stark verarbeiteter Lebensmittel, wie z. B. Muschelkonserven mit stark degradierter DNA, bei denen die Fragmentlängen nicht für eine Amplifikation der Zielsequenzen ausreichen, ist dieses Dokument in der Regel nicht geeignet. Außerdem ist es nicht anwendbar auf zusammengesetzte Meeresfrüchteprodukte, die mehr als eine Muschelspezies enthalten.

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 20813, *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*

3 Begriffe

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

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

— IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

3.1

Alignment

Prozess oder Ergebnis eines Abgleichs der Nukleotidreste zweier oder mehrerer biologischer Sequenzen, um eine maximale Übereinstimmung zu erzielen

[QUELLE: BLAST Glossary]

3.2

BLAST

Basic Local Alignment Search Tool [3]

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

Anmerkung 1 zum Begriff: Mit dem Algorithmus werden Alignments durch Maximierung eines Wertes für lokale Übereinstimmungen, dem „maximum signal pair (MSP) score“ oder „high scoring signal pair (HSP) score“, optimiert.

3.3

FASTA-Format

textbasiertes Format zur Darstellung von Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen, welches mit einer einzeiligen Beschreibung beginnt, der Zeilen mit Sequenzdaten folgen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Bescheidungszeile („define“) wird am Anfang von den Sequenzdaten durch ein „Größer-als“-Zeichen („>“) abgegrenzt.

BEISPIEL Eine Beispielsequenz im FASTA-Format ist im Folgenden dargestellt:

> Probe_04_16SrRNA-Gen

```
ATCACGTTAGGATTTTAAATGGGCGAACATACCAACCATTGAGACCGCCTACAGCCTCAGGATATCCG-
GAGCCAACATCGAGGTCGCAAACCTTTCTCATCTATAAGAATATCAAAGAAAATAACGCTGTTATCCCCG-
GAGTAACCTTCTTCTGTTAATCACTAAATAAAGTAAGTGGGTCGTCTATCAAACAAAGAAAAGAAAGAGTCTGATCTTGCTCTTT-
TGCTGCCCCAGCCAACAACAAAAGTGGAAGAATATCTCTGCCACTTAGTTAACAACCTTCACGGGGTCTTCTCGTCTATCACTTA-
TATTTAAGCATTTGCACTTAAATTTCAATTTTCATATAATTCAGCTAGAGACAGTTATAGGCTCGTCAATCCATTACAGGGCCCC-
CAATTAGAGGGCCATAATTTAGCTACCTTAGCAGCCTTTACCGCATCCGTTTAAAGTCATCTCACTGGGAAGGAACGACCTACTATA-
AATACAGTAGGCCATGTTTTT
```

[QUELLE: BLAST Topics, modifiziert]

3.4

GenBank

umfangreiche öffentliche Datenbank, z. B. für genetische Sequenzen [5]

Anmerkung 1 zum Begriff: GenBank ist Teil der International Nucleotide Sequence Database Collaboration, welche die DNA DataBank of Japan (DDBJ), das European Nucleotide Archive (ENA) und die GenBank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) umfasst. Diese drei Organisationen tauschen täglich Daten aus.

3.5

Identität

Ausmaß, in dem zwei (Nukleotid- oder Aminosäure-)Sequenzen die gleichen Reste an den gleichen Positionen in einem Alignment haben, oftmals als prozentualer Anteil angegeben

[QUELLE: BLAST Glossary]

3.6

introgressierte DNA

DNA-Sequenz (Allel) einer taxonomischen Einheit (Spezies), die in den Genpool einer anderen, artfremden Einheit (Spezies) integriert ist [6]

Anmerkung 1 zum Begriff: Introgression ist in der Regel eine Folge von Hybridisierung und Rückkreuzung von Individuen verschiedener Spezies.

3.7

NCBI

National Center for Biotechnology Information

Einrichtung, die molekularbiologische Datenbanken (z. B. GenBank) betreibt und die BLAST-Sammlung bereitstellt

3.8

Nukleotid-Sammlung

nr/nt

nicht-redundante Datenbank, die aus GenBank-Sequenzen besteht, bei denen identische Sequenzen zu einem Eintrag zusammengefasst wurden

3.9

Eingabesequenz

Sequenz (oder andere Art einer Suchanfrage), mit der alle in einer Datenbank enthaltenen Einträge abzugleichen sind

[QUELLE: BLAST Glossary]

3.10

Abdeckung der Eingabesequenz

prozentualer Anteil der Eingabesequenz, welcher durch das Alignment mit der Datenbanksequenz abgedeckt wird

[QUELLE: BLAST Help]

4 Kurzbeschreibung

Mit einem geeigneten Verfahren wird DNA aus Muscheln und Muschelprodukten extrahiert. Ein Segment aus etwa 550 Basenpaaren (bp) des 16S rRNA-Gens wird durch PCR amplifiziert. Dann wird mit einer geeigneten DNA-Sequenzierungsmethode (z. B. Sanger-Sequenzierung) die Nukleotidsequenz des PCR-Produkts ermittelt. Die Sequenz wird durch den Vergleich mit Sequenzeinträgen in Datenbanken bewertet, was eine Zuordnung der Sequenz zu einer Muschelspezies oder -gattung anhand der Identitätsübereinstimmung mit den dort eingetragenen Sequenzen ermöglicht.

5 Chemikalien und Hilfsmittel

5.1 Allgemeines

Falls nicht anders festgelegt, werden für die Analyse ausschließlich Reagenzien mit einem für die Molekularbiologie anerkannten Reinheitsgrad sowie destilliertes oder entmineralisiertes Wasser oder Wasser vergleichbarer Qualität nach ISO 20813 verwendet. Hinsichtlich der Labororganisation siehe ISO 20813.

5.2 PCR-Reagenzien

5.2.1 Thermostabile DNA-Polymerase (für die Hot-Start-PCR)¹

5.2.2 PCR-Reaktionspuffer (mit MgCl₂ oder mit separater MgCl₂-Lösung)¹

5.2.3 Desoxynukleosidtriphosphat-Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)²

5.2.4 Oligonukleotide (siehe Tabelle 1)

Tabelle 1 — Oligonukleotide für die Amplifikation der 16S rRNA-Genregion [1] [2]

Bezeichnung	DNA-Sequenz des Oligonukleotids
16SAR	5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3'
16SBR	5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'

5.2.5 Agarose

1 Während des Ringversuchs verwendeten die Laboratorien DNA-Polymerasen und Mastermixe verschiedener kommerzieller Anbieter. Mit allen Mastermixen und DNA-Polymerasen wurden die Amplifikate erfolgreich erzeugt.

2 Die Desoxynukleotidtriphosphate können auch in einem handelsüblichen PCR-Mastermix enthalten sein.

5.2.6 Geeigneter DNA-Längenstandard für die Beurteilung der Amplikonlänge

6 Prüfeinrichtung

Zusätzlich zur gewöhnlichen Laborausstattung werden folgende Geräte benötigt:

6.1 UV-Spektralphotometer oder Fluorometer zur Bestimmung der DNA-Konzentration

6.2 Thermocycler

6.3 Gelelektrophoresegerät

6.4 Geldokumentationssystem

6.5 DNA-Sequenzierungsautomat

7 Durchführung

7.1 Probenvorbereitung

Es muss sichergestellt werden, dass die zur DNA-Extraktion verwendete Einwaage repräsentativ für die Laborprobe ist. Bei zusammengesetzten Proben (z. B. Meeresfrüchte-Mischungen) müssen einzelne reine Muschelstücke separiert und analysiert werden. Bei der Analyse von Proben, die aus mehreren Stücken bestehen (z. B. Tüten mit mehreren Muschelfilets), werden Einwaagen für jede vermeintliche Muschelspezies entnommen und separat analysiert. Um das Risiko der Amplifikation von anhaftendem Fremdmaterial zu minimieren, darf die Untersuchungsprobe nicht an der Oberfläche der Laborprobe entnommen werden. Für weitere Informationen bezüglich der Probenvorbereitung siehe ISO 20813.

7.2 DNA-Extraktion

Für die Extraktion von DNA aus der Untersuchungsprobe sollten die in EN ISO 21571 beschriebenen allgemeinen Anleitungen und Maßnahmen befolgt werden, siehe ISO 20813. Es wird empfohlen, eins der in EN ISO 21571:2005³, Anhang A, beschriebenen DNA-Extraktionsverfahren anzuwenden. Alternativ können handelsübliche Kits für die Extraktion und Reinigung der DNA verwendet werden.

7.3 PCR

7.3.1 Allgemeines

Bei den für die Amplifikation des Abschnitts des mitochondrialen 16S rRNA-Gens verwendeten Primern handelt es sich um universelle Primer. Das Primerpaar 16SAR / 16SBR wurde an einem breiten taxonomischen Spektrum von Muschelspezies geprüft und hat nur in wenigen Fällen versagt (< 5 % der geprüften Spezies) [1].

7.3.2 PCR-Ansatz

Das Verfahren wurde für ein Gesamtvolumen von 25 µl je PCR validiert. Für die 16S rRNA-PCR sollten die in Tabelle 2 angegebenen Reagenzien verwendet werden.

Die Reagenzien werden bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut und sollten vor der Verwendung kurz zentrifugiert werden. Es wird ein PCR-Reagenziengemisch hergestellt, das bis auf das DNA-Extrakt alle PCR-Komponenten in den angegebenen Konzentrationen enthält. Die Menge des PCR-Reagenziengemisches hängt vom Gesamtvolumen je PCR sowie von der Gesamtzahl der Reaktionen ab und enthält eine ausreichende Pipettierreserve.

³ EN ISO 21571:2005 wird derzeit durch EN ISO 21571:2005/A1:2013 geändert.

Positive PCR-Ergebnisse werden bei der Verwendung einer DNA-Konzentration von ungefähr 1 ng/µl Reaktionslösung erwartet. Falls es notwendig ist, das PCR-Ergebnis zu verbessern, darf die eingesetzte DNA-Menge erhöht werden (z. B. um die Ausbeute des PCR-Produkts zu erhöhen) oder verringert werden (z. B. um eine PCR-Inhibition zu vermeiden).

Tabelle 2 — Komponenten für die 16S rRNA-PCR

Reagens (Stammlösung)	Endkonzentration in der Reaktionslösung
PCR-Puffer	1-fach
MgCl ₂ ^a	1,5 mmol/l
dNTP-Mix ^a	0,2 mmol/l je dNTP
Primer 16SAR	400 nmol/l
Primer 16SBR	400 nmol/l
Hot-Start-DNA-Polymerase	0,5 Einheiten bis 1 Einheit
Wasser	auf Endvolumen auffüllen
Proben-DNA	etwa 1 ng/µl
^a Das Reagens wird nur verwendet, falls nicht bereits im PCR-Puffer enthalten.	

Die PCR-Reagenzien werden gemischt, das Gemisch wird kurz zentrifugiert und in die einzelnen Reaktionsansätze aufgeteilt. Die zu untersuchenden DNA-Extrakte bzw. PCR-Kontrollen (siehe 7.3.4) werden in die verschiedenen Reaktionslösungen pipettiert. Die Reaktionsansätze werden in den Thermocycler überführt und das Temperatur-Zeit-Programm wird gestartet.

Für weiterführende Informationen zu PCR-Kontrollen siehe auch ISO 20813.

7.3.3 Temperatur-Zeit-Programm

Das in Tabelle 3 dargestellte Temperatur-Zeit-Programm wurde im Ringversuch erfolgreich angewendet. Die Verwendung von abweichenden Reaktionsbedingungen und PCR-Cyclern kann eine gezielte Optimierung erfordern. Die Zeit bis zur ersten Denaturierung hängt dabei von der verwendeten Hot-Start-DNA-Polymerase ab.

Tabelle 3 — Temperatur-Zeit-Programm für die 16S rRNA-PCR

Schritt	Parameter		Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Erste Denaturierung/Aktivierung der Hot-Start-DNA-Polymerase		95 °C	10 min	1
2	Amplifikation	Denaturierung	95 °C	15 s	35
		Primeranlagerung	50 °C	30 s	
		Elongation	72 °C	60 s	
3	Abschließende Elongation		72 °C	5 min	1

Nach Abschluss der PCR werden die Proben bis zur weiteren Untersuchung im Kühlschrank gelagert.

7.3.4 PCR-Kontrollen

Zusätzlich zu den Reaktionsansätzen für die zu analysierenden Proben müssen eine PCR-Reagenzienkontrolle sowie eine negative Extraktionskontrolle (siehe EN ISO 24276) durchgeführt werden.