

## DIN EN 18033



ICS 07.080; 67.020; 67.120.10

Einsprüche bis 2024-01-10

**Entwurf****Lebensmittelauthentizität –  
Quantifizierung von Equiden-DNA im Verhältnis zu Säugetier-DNA in  
rohem Rindfleisch;  
Deutsche und Englische Fassung prEN 18033:2023**

Food authenticity –  
Quantitation of equine DNA relative to mammalian DNA in raw beef (meat);  
German and English version prEN 18033:2023

Authenticité des aliments –  
Quantification de l'ADN équin par rapport à l'ADN mammalien dans des échantillons de  
viande de boeuf crue;  
Version allemande et anglaise prEN 18033:2023

**Anwendungswarnvermerk**

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-11-10 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument 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](http://www.din.de/go/entwuerfe) bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter [www.entwuerfe.normenbibliothek.de](http://www.entwuerfe.normenbibliothek.de), sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an [nal@din.de](mailto:nal@din.de) möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter [www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe](http://www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe) oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter [www.dke.de/stellungnahme](http://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.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 33 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

## **Nationales Vorwort**

Dieses Dokument (prEN 18033:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, 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).

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](http://www.din.de)) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

**Lebensmittelauthentizität – Quantifizierung von Equiden-DNA im Verhältnis zu Säugetier-DNA in rohem Rindfleisch**

Food authenticity – Quantitation of equine DNA relative to mammalian DNA in raw beef (meat)

Authenticité des aliments – Quantification de l'ADN équin par rapport à l'ADN mammalien dans des échantillons de viande de boeuf crue

## **Inhalt**

|                                                                         | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------|-------|
| Europäisches Vorwort . . . . .                                          | 3     |
| Einleitung . . . . .                                                    | 4     |
| 1 Anwendungsbereich . . . . .                                           | 5     |
| 2 Normative Verweisungen . . . . .                                      | 5     |
| 3 Begriffe . . . . .                                                    | 5     |
| 4 Kurzbeschreibung . . . . .                                            | 5     |
| 5 Reagenzien und Werkstoffe . . . . .                                   | 6     |
| 6 Prüfeinrichtung . . . . .                                             | 8     |
| 7 Durchführung . . . . .                                                | 8     |
| 7.1 Vorbereitung der Prüfmenge/Untersuchungsprobe . . . . .             | 8     |
| 7.2 Herstellung von DNA-Extrakten . . . . .                             | 8     |
| 7.3 Herstellung von pferdespezifischen Kalibrierstandards . . . . .     | 8     |
| 7.4 PCR-Ansatz . . . . .                                                | 9     |
| 7.4.1 Proben und Kontrollen . . . . .                                   | 9     |
| 7.4.2 Reaktionsgemische . . . . .                                       | 9     |
| 7.4.3 Anordnen der Platte des Thermocyclers für Real-time-PCR . . . . . | 10    |
| 7.4.4 Temperatur-Zeit Programm . . . . .                                | 10    |
| 8 Kriterien für Annahme/Zurückweisung . . . . .                         | 10    |
| 8.1 Allgemeines . . . . .                                               | 10    |
| 8.2 Datenanalyse . . . . .                                              | 11    |
| 9 Validierungsstatus und Leistungskriterien . . . . .                   | 12    |
| 9.1 Allgemeines . . . . .                                               | 12    |
| 9.2 Wiederholpräzision . . . . .                                        | 12    |
| 9.3 Vergleichpräzision . . . . .                                        | 12    |
| 9.4 Nachweisgrenze (LOD, en: Limit of Detection) . . . . .              | 13    |
| 9.5 Bestimmungsgrenze (LOQ, en: Limit of Quantitation) . . . . .        | 13    |
| 9.6 Spezifität . . . . .                                                | 13    |
| 10 Prüfbericht . . . . .                                                | 13    |
| Literaturhinweise . . . . .                                             | 15    |

## **Tabellen**

|                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1 — Oligonukleotide für die Amplifikation der equidenspezifischen Genregion [1] . . . .                                                      | 7  |
| Tabelle 2 — Oligonukleotide für die Amplifikation der Säugetier-Genregion [2] . . . . .                                                              | 7  |
| Tabelle 3 — Erstellung einer pferdespezifischen 5-Punkt-Kalibrierkurve mit siebenfacher Verdünnung . . . . .                                         | 9  |
| Tabelle 4 — Reaktionsansatz für die Amplifikation . . . . .                                                                                          | 10 |
| Tabelle 5 — Temperatur-Zeit-Programm für die Equiden- und Säugetier-PCR . . . . .                                                                    | 10 |
| Tabelle 6 — Zusammenfassung der bei der Bewertung des Verfahrens in einem Ringversuch erzielten Ergebnisse für die Leistung des Verfahrens . . . . . | 13 |

## Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 18033:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittelauthentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

## **Einleitung**

Die Lebensmittelauthentizität und -integrität sind Schwerpunkte des Verbraucherschutzes. In den letzten drei Jahrzehnten hat im Handel mit Lebensmitteln ein Globalisierungsprozess stattgefunden. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Verfahren eingeführt, bei denen PCR- und insbesondere Real-time-PCR-Protokolle zur Identifizierung von Tierarten angewendet werden, die zum Lebensmittelverzehr verwendet werden (z. B. Schweine, Rinder, Schafe, Pferde, Hühner und Puten).

Die Pferdefleisch-Problematik in der Europäischen Union (EU) und im Vereinigten Königreich (UK) im Jahr 2013, bei der eine erhebliche Menge an Pferde-DNA in einem Rindfleisch-Burger gefunden wurde, der für den öffentlichen Verkauf in einem Supermarkt bestimmt war, machte deutlich, dass die Entwicklung harmonisierter und genormter Verfahrensvorschriften für die Authentifizierung von Fleischerzeugnissen notwendig ist, um verlässliche Verfahren für den Nachweis von potentiellern Lebensmittelbetrug zu etablieren.

Diese Norm enthält Informationen des öffentlichen Sektors, die unter der UK Open Government Licence v3.0 lizenziert sind (Open Government Licence [nationalarchives.gov.uk]).

## 1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Real-time-PCR-Verfahren für die Quantifizierung der Menge an Equiden-DNA im Verhältnis zur gesamten Säugetier-DNA in einer Probe von rohem Fleisch fest.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung auf Equiden (Equiden-Assay) werden in Form von Kopienzahlen des haploiden Genoms von Equiden (Gattung *Equus*) im Verhältnis zu den Kopienzahlen des haploiden Genoms von Säugetieren insgesamt ausgedrückt. Diese Untersuchung ist spezifisch für Vertreter der Gattung *Equus* und weist daher DNA von Pferden, Maultieren, Eseln und Zebras nach.

Das Verfahren wurde zuvor in einem Ringversuch validiert und auf DNA angewendet, die aus Proben extrahiert wurde, die aus rohem Pferdefleisch in rohem Rindfleisch als Hintergrund bestehen.

Die Nachweisgrenze wurde experimentell auf mindestens 9 Kopien von Genomäquivalenten (~ 17 haploide Zielgenkopien) sowohl für das Pferdegenom (*E. caballus*) als auch für das Säugetiergenom (Proben von rohem Fleisch) auf der Grundlage der niedrigsten Verdünnung auf den jeweiligen Kalibrierkurven durch Einzella-borvalidierung bestimmt. Der niedrigste relative Pferdeanteil der in den Ringversuch einbezogenen Zielse-quenz war ein Massenanteil von 0,1 % auf der Grundlage von gravimetrisch vorbereitetem rohem Pferde-Muskelgewebe in rohem Rinder-Muskelgewebe als Hintergrund.

Der Prozess der Konformitätsbewertung ist nicht Teil dieses Dokuments.

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

EN ISO 21571:2005, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Nukleinsäureextraktion (ISO 21571)*

ISO 16577, *Molecular biomarker analysis — Vocabulary for molecular biomarker analytical methods in agriculture and food production*

## 3 Begriffe

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

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 <https://www.electropedia.org/>

## 4 Kurzbeschreibung

Untersuchungsproben, die Equiden-DNA in Rinder-DNA als Hintergrund enthalten, werden unter Anwendung eines relativen Quantifizierungsansatzes unter Verwendung von Singleplex-Real-time-PCR-Assays analysiert, die auf das equine Wachstumshormonrezeptor-Gen [1] und das Myostatin-Gen [2] abzielen, die bei Säugetieren und Geflügel vorkommen. Die Konzentration der DNA-Matrize wird vor der Real-time-PCR quantifiziert, um die Eingangsmengen bei der Untersuchung zu normieren. 100%ige Pferde-DNA (*E. caballus*) aus authentifiziertem rohem Pferdefleisch, das auf die gleiche Weise wie die Untersuchungsproben extrahiert und behandelt wurde,

wird zur Erstellung getrennter Kalibrierkurven sowohl für die equidenspezifische Zielsequenz als auch für die Säugetier-Zielsequenz auf der Grundlage geschätzter Genomäquivalente verwendet. Die Untersuchungsproben werden mit den gleichen equidenspezifischen und universellen Säugetier-qPCR-Assays ausgewertet. Die geschätzten Genomäquivalent-Kopienzahlen werden für die Untersuchungsproben anhand der Kalibrierkurven für Equiden und Säugetiere bestimmt. Der prozentuale Gehalt an Equiden-DNA der Untersuchungsprobe wird als Verhältnis der Anzahl der haploiden Genomäquivalente von Equiden im Verhältnis zu der Gesamtanzahl haploider Genomäquivalente von Säugetieren in der Probe ausgedrückt.

## 5 Reagenzien und Werkstoffe

### 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 EN ISO 20813 verwendet. Hinsichtlich der Labororganisation siehe EN ISO 20813. Obwohl es nicht zwingend erforderlich ist, die in der Norm festgelegten Reagenzien, Geräte oder Bedingungen zu verwenden, liegt es in der Verantwortung des Labors, die erzielten Ergebnisse zu validieren, wenn es sich dagegen entscheidet.

### 5.2 PCR-Mastermix

Der PCR-Mastermix enthält thermostabile DNA-Polymerase, pH-Puffer, KCl,  $\text{MgCl}_2$ , Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) und die vier dNTP (dATP, dCTP, dGTP und dUTP) als verdünnbares Konzentrat, das gebrauchsfertig ist<sup>1, 2, 3</sup>.

### 5.3 Oligonukleotide

Die Qualität der Oligonukleotide muss für deren Verwendung als Primer und Sonden ausreichend sein. Siehe Tabelle 1 und Tabelle 2.

- 
- 1 Im Ringversuch wurde ein 2fach konzentrierter TaqMan® Universal PCR-Mastermix verwendet, der qPCR-Puffer, Hot-Start-Taq-Polymerase und den passiven Referenzfarbstoff ROX enthält.
  - 2 Die Rezeptur des verwendeten PCR-Mastermixes muss für die Verwendung mit der Marke und dem Modell des eingesetzten Thermocyclers geeignet sein. Gleichwertige Produkte zu den festgelegten dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.
  - 3 Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN.

# - Entwurf -

**Tabelle 1 — Oligonukleotide für die Amplifikation der equidenspezifischen Genregion [1]**

| Bezeichnung                                                                                                                                     | DNA-Sequenz des Oligonukleotids                        | Endkonzentration in der PCR |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Equines Wachstumshormonrezeptor-Gen, GenBank-Eintragungsnummer AF392878 <sup>a</sup>                                                            |                                                        |                             |
| EC-GHR1-F<br>(Vorwärts-Primer)                                                                                                                  | 5'-CCAACTTCATCATGGACAACGC-3'                           | 0,2 µM                      |
| EC-GHR1-R<br>(Rückwärts-Primer)                                                                                                                 | 5'-GTTAAAGCTTGGCTCGACACG-3'                            | 0,2 µM                      |
| EC-GHR1_(P)<br>(Sonde)                                                                                                                          | 5'-[FAM]-AAGTGCATCCCCGTGGCCCCTCA-[NFQ]-3' <sup>b</sup> | 0,2 µM                      |
| <sup>a</sup> PCR-Produkt = 600-CCAACTTCATCATGGACAACGCCTACTTCTGTGAGGCAGATGCCAAAAAGTGCATCCCCGTGGCCCCTCACGTGCGAGGTTGAATCACGTGTCGAGCCAAGCTTTAAC-706 |                                                        |                             |
| <sup>b</sup> FAM: 6-Carboxyfluorescein, NFQ: nicht fluoreszierender Quencherfarbstoff                                                           |                                                        |                             |

**Tabelle 2 — Oligonukleotide für die Amplifikation der Säugetier-Genregion [2]**

| Bezeichnung                                                                                                                            | DNA-Sequenz des Oligonukleotids                             | Endkonzentration in der PCR |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Myostatin-Gen, GenBank-Eintragungsnummer AF320998 <sup>a</sup>                                                                         |                                                             |                             |
| MY-f<br>(Vorwärts-Primer)                                                                                                              | 5'-TTGTGCAAATCCTGAGACTCAT-3'                                | 0,3 µM                      |
| MY-r<br>(Rückwärts-Primer)                                                                                                             | 5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'                                  | 0,3 µM                      |
| MY-Sonde<br>(Sonde)                                                                                                                    | 5'-[FAM]-CCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTG-[NFQ-3'] <sup>b</sup> | 0,2 µM                      |
| <sup>a</sup> PCR-Produkt = 2500-TTGTGCAAATCCTGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTGGAATCCGATCTCTGAAACTTGACATGAACCCAGGCACTGGTAT-2596 |                                                             |                             |
| <sup>b</sup> FAM: 6-Carboxyfluorescein, NFQ: nicht fluoreszierender Quencherfarbstoff                                                  |                                                             |                             |

#### 5.4 Authentische Pferde-DNA-Probe

Die Probe muss aus rohem Muskelgewebe bestehen, das von oberflächlichem intermuskulärem Fett und Bindegewebe gesäubert wurde. Das Ausgangsmaterial sollte aus geeigneten Referenzmaterialien oder aus intern entwickelten Materialien stammen, die durch geeignete Verifizierungsprüfungen für Fleisch, z. B. durch Analysen auf der Grundlage von DNA-Sequenzierung oder durch Verifizierung durch die zuständige Behörde, authentifiziert wurden. Gereinigte und quantifizierte genomische DNA aus authentifiziertem Pferde-Muskelgewebe mit einem Massenanteil von 100 % muss die empfohlenen Qualitätsmerkmale [1] einhalten (d. h. spektrophotometrische Messung der Verhältnisse  $A_{260}/A_{280} \sim 1,8$  und  $A_{260}/A_{230} \sim 1,8$  bis  $2,2$ ).

### 6 Prüfeinrichtung

#### 6.1 Allgemeines

Die Anforderungen an Prüfeinrichtung und Werkstoffe müssen EN ISO 20813 entsprechen. Das folgende Gerät ist erforderlich:

#### 6.2 Thermocycler für Real-time-PCR.

Für die PCR ein Gerät verwenden, das DNA *in vitro* amplifiziert und die Temperatur-Zeit-Zyklen durchführt. Darüber hinaus muss das Gerät in der Lage sein, Fluoreszenzmoleküle bei bestimmten Wellenlängen anzuregen und das emittierte Fluoreszenzlicht des verwendeten Fluorophors zu detektieren, das ausreicht, um Real-time-PCR-Assays unter Verwendung von Hydrolysesonden durchzuführen.

### 7 Durchführung

#### 7.1 Vorbereitung der Prüfmenge/Untersuchungsprobe

Die für die DNA-Extraktion verwendete Untersuchungsprobe muss repräsentativ für die Laborprobe und homogen sein, z. B. durch Zerkleinern oder Homogenisieren der Laborprobe zu einem feinen Gemisch. Die Vorbereitung der Prüfmenge/Untersuchungsprobe erfolgt nach den in EN ISO 21571 beschriebenen allgemeinen Anforderungen und spezifischen Verfahren.

#### 7.2 Herstellung von DNA-Extrakten

Die Extraktion/Reinigung und Quantifizierung der DNA aus der Prüfmenge erfolgt nach den in EN ISO 21571 aufgeführten allgemeinen Anforderungen und Verfahren.

Die in EN ISO 21571:2005, Anhang A beschriebenen DNA-Extraktionsverfahren sind empfohlen. Es liegt in der Verantwortung des Analyselabors, sicherzustellen, dass die extrahierte DNA für den Zweck geeignet ist. Wie in 5.4 angegeben, muss die gesamte gereinigte genomische DNA die empfohlenen Qualitätsmerkmale einhalten [3].

#### 7.3 Herstellung von pferdespezifischen Kalibrierstandards

Ein Beispiel für die Herstellung von Kalibrierstandards ist in Tabelle 3 angeführt, z. B. Herstellung einer 5-Punkt-Verdünnungsreihe (S1 bis S5) im Bereich von etwa 24 010 bis 10 Kopien von Genomäquivalenten vom Pferd unter Verwendung quantifizierter genomischer DNA vom Pferd mit einem Massenanteil von 100 % als Kalibriersubstanz, verdünnt auf 26 ng/μl (130 ng je 5 μl) in Wasser (siehe Tabelle 3).