

DIN EN 18057



ICS 67.120.10

Einsprüche bis 2024-04-16

Entwurf

**Lebensmittelauthentizität –
Quantifizierung von Reh-DNA im Verhältnis zu Säugetier-DNA in Fleisch
und Fleischprodukten;
Deutsche und Englische Fassung prEN 18057:2024**

Food authenticity –

Quantitation of roe deer DNA relative to mammalian DNA in meat and meat products;
German and English version prEN 18057:2024

Authenticité des aliments –

Quantification de l'ADN de chevreuil par rapport à l'ADN de mammifère dans la viande et les
produits carnés;

Version allemande et anglaise prEN 18057:2024

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-02-16 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 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.

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

Gesamtumfang 39 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 18057:2024) 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.

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

ISO 5725-3 siehe DIN ISO 5725-3

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 ISO 5725-3, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 3: Präzisionsmaße eines vereinheitlichten Messverfahrens unter Zwischenbedingungen*

– Leerseite –

Februar 2024

prEN 18057

Lebensmittelauthentizität – Quantifizierung von Reh-DNA im Verhältnis zu Säugetier-DNA in Fleisch und Fleischprodukten

Food authenticity – Quantitation of roe deer DNA relative to mammalian DNA in meat and meat products

Authenticité des aliments – Quantification de l'ADN de chevreuil par rapport à l'ADN de mammifère dans la viande et les produits carnés

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	5
5 Reagenzien und Materialien	6
6 Gerät	7
7 Durchführung	7
7.1 Herstellung der Prüfmenge/Probe	7
7.2 Herstellung von DNA-Extrakten	7
7.3 Herstellung von Reh- und Säugetier-Kalibrierstandards	8
7.4 PCR-Ansatz	8
7.4.1 Proben und Kontrollen	8
7.4.2 Reaktionsgemische	8
7.4.3 Thermocycler-Plattenkonfiguration für die Realtime-PCR	9
7.4.4 Temperatur-Zeit-Programm	9
8 Kriterien für Annahme/Zurückweisung	9
8.1 Allgemeines	9
8.2 Datenanalyse	10
9 Validierungsstatus und Leistungskriterien	11
9.1 Allgemeines	11
9.2 Wiederholpräzision	13
9.3 Vergleichpräzision	13
9.4 Wiederfindung	13
9.5 Nachweisgrenze (<i>LOD</i>)	13
9.6 Spezifität	14
10 Prüfbericht	14
Literaturhinweise	17

Tabellen

Tabelle 1 — Oligonukleotide für die Amplifizierung der rehspezifischen Genregion [1]	6
Tabelle 2 — Oligonukleotide für die Amplifikation der Säugetier- und Geflügel-Genregion [2]	7
Tabelle 3 — Herstellung einer 5-Punkt-Kalibrierkurve mit vierfachen Verdünnungsstufen	8
Tabelle 4 — Reaktionsansatz für die Amplifizierung	9
Tabelle 5 — Temperatur-Zeit-Programm für die Reh- und die Säugetier-PCR	9
Tabelle 6 — Zusammensetzung der Proben für den Ringversuch [6]	11
Tabelle 7 — Qualitative Ergebnisse des Ringversuchs für das rehspezifische Verfahren [6]	12
Tabelle 8 — Quantitative Ergebnisse des Ringversuchs für das rehspezifische Verfahren [6]	12
Tabelle 9 — Herstellung der DNA-Verdünnungsreihe zur Bestimmung der <i>LOD</i>	14
Tabelle 10 — Bestimmung der <i>LOD</i> der rehspezifischen Realtime-PCR	14

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 18057:2024) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 460 „Lebensmittel-authentizität“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Lebensmittelauthentizität und -integrität sind wesentliche Aspekte in Bezug auf den Verbraucherschutz. In den letzten drei Jahrzehnten ist es im Lebensmittelhandel zur Globalisierung gekommen. In den vergangenen Jahrzehnten wurden viele Verfahren mit Anwendung der PCR, und insbesondere von Realtime-PCR-Protokollen, zur Identifizierung von Tierarten, die bei Lebensmitteln zum Verzehr eingesetzt werden (z. B. Schwein, Rind, Schaf, Pferd, Huhn und Pute), etabliert.

Wildfleisch ist besonders für eine betrügerische Etikettierung gefährdet, da es wertvoller ist als Fleisch, das aus Haustieren gewonnen wird. Verschiedene Wildfleischprodukte, die häufig Rotwild oder Rehwild enthalten, sind im Handel erhältlich. Zur Überprüfung der korrekten Kennzeichnung von handelsüblichen Wildfleischprodukten ist die Entwicklung von harmonisierten und genormten Protokollen für die Authentifizierung von Fleischprodukten wichtig, um zuverlässige Verfahren für den Nachweis von möglichem Lebensmittelbetrug zu etablieren.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Realtime-PCR-Verfahren für die Quantifizierung der Menge an Reh-DNA im Verhältnis zur gesamten Säugetier- und -Geflügel-DNA in Fleisch und Fleischprodukten fest.

Die Ergebnisse dieses Testverfahrens für Reh werden als Kopienzahlen je haploidem Genom des Rehs (*Capreolus capreolus*) im Verhältnis zu den Kopienzahlen je gesamtem haploidem Säugetier-Genom angegeben. Der Gehalt an Reh kann unter Verwendung von gravimetrisch hergestelltem Kalibriermaterial aus Fleischmischungen oder Musterproben auch als Massenanteil in Prozent angegeben werden.

Das Verfahren ist zuvor in einem Ringversuch validiert und auf DNA angewendet worden, die aus Proben einer Mischung aus rohem Rehfleisch in rohem Schweinefleisch (als Hintergrund) sowie aus rohen und gekochten Würsten extrahiert wurde.

Die Nachweisgrenze der Reh-PCR wurde experimentell zu mindestens 5 Kopien des Zielgens, entsprechend einem Gehalt von 0,03 % Reh, bestimmt.

Die Verfahrensweise zur Beurteilung der Übereinstimmung ist nicht Gegenstand 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, *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 Reh-DNA neben einem Hintergrund an DNA aus anderen Säugetier- oder Geflügelspezies enthalten, werden nach einem relativen Quantifizierungsansatz analysiert, bei dem Singleplex-qPCR-Tests genutzt werden, um die Promotorregion des Lactoferrin-Gens des Rehs [1] bzw. das in Säugetieren und Geflügel vorhandene Myostatin-Gen [2] als Zielsequenz nachzuweisen. Die Konzentration der DNA-Template wird vor der Realtime-PCR quantifiziert, um die Eingangskonzentrationen beim Test zu normalisieren. DNA wird aus Muster-Fleischmischungen, die aus authentifiziertem Rehfleisch in Fleisch anderer Säugetierspezies als Hintergrund stammen, extrahiert, oder es werden Lösungen genomischer Reh-DNA und DNA anderer Säugetierspezies verwendet und verdünnt, um getrennte Kalibrierkurven sowohl für die rehspezifische Zielsequenz als auch die Säugetier-Zielsequenz zu erstellen. Untersuchungsproben,

die auf dieselbe Weise wie die Kalibrierstandards extrahiert werden, werden in demselben PCR-Lauf mit dem rehspezifischen und dem universellen Säugetier-qPCR-Test untersucht. Anhand der rehspezifischen und der Säugetier-Kalibrierkurve werden die Konzentrationen der Reh-DNA bzw. der Säugetier-DNA in den Untersuchungsproben bestimmt. Der prozentuale Reh-DNA-Gehalt in der Untersuchungsprobe wird als Verhältnis der Menge an Reh-DNA zur gesamten Säugetier-DNA in der Probe angegeben.

5 Reagenzien und Materialien

Während der Analyse sind, sofern nicht anders festgelegt, nur Reagenzien von anerkanntem molekularbiologischem Reinheitsgrad sowie destilliertes oder entmineralisiertes Wasser oder Wasser gleichwertiger Reinheit nach EN ISO 20813 zu verwenden. In Bezug auf die Labororganisation wird auf EN ISO 20813 verwiesen. Zwar ist es nicht zwingend erforderlich, die in der Norm festgelegten Reagenzien, Geräte oder Bedingungen anzuwenden; sollte ein Laboratorium jedoch entscheiden, dies nicht zu tun, dann ist das Laboratorium dafür verantwortlich, die erhaltenen Ergebnisse zu validieren.

5.1 PCR-Mastermix

Der PCR-Mastermix enthält eine thermostabile DNA-Polymerase sowie pH-Puffer, KCl, $MgCl_2$ und die vier dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und dUTP) als gebrauchsfertiges verdünnungsfähiges Konzentrat.^{1 2}

5.2 Oligonukleotide

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

Tabelle 1 — Oligonukleotide für die Amplifizierung der rehspezifischen Genregion [1]

Bezeichnung	DNA-Sequenz des Oligonukleotids	Endkonzentration in PCR
Promotorregion des Lactoferrin-Gens des Rehs, GenBank® Zugangsnummer AY122040 ^a		
Reh 2a FW (Vorwärtsprimer)	5'-TGGCTGCTGCGTGCAGAA-3'	0,2 µM
Reh 2a RV (Rückwärtsprimer)	5'-TCTAAAATGCTTGGGAACCAGATAT-3'	0,2 µM
Reh 2a Pr (Sonde)	5'-[FAM]-GAAGGGTCTCCGTCTGC-[NFQ-MGB] ^b -3'	0,1 µM
^a PCR-Produkt = 212 - TGGCTGCTGCGTGCAGAAATGAAGGGTCTCCGTCTGCCATATCTGGTCCCAAGCATTTTAGA - 273		
^b FAM: 6-Carboxyfluorescein, NFQ-MGB: nicht fluoreszierender Quencher; bindet an die kleine Furche der DNA (en: non-fluorescent quencher minor groove binder)		

- 1 Während des Ringversuchs wurde das QuantiTect® Multiplex PCR Kit (von Qiagen) verwendet. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.
- 2 Die Formulierung des eingesetzten PCR-Mastermixes muss für die Verwendung mit dem eingesetzten Fabrikat und Modell des Thermocyclers geeignet sein. Produkte, die zu den angegebenen Produkten gleichwertig sind, dürfen verwendet werden, wenn nachgewiesen werden kann, dass sie zu den gleichen Ergebnissen führen.

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

Bezeichnung	DNA-Sequenz des Oligonukleotids	Endkonzentration in PCR
Myostatin-Gen, GenBank® Zugangsnummer AF320998 ^a		
MYw-f (Vorwärtsprimer)	5'-TTGTGCGATCCTGAGACTCAT-3'	0,2 µM
MY-r (Rückwärtsprimer)	5'-ATACCAGTGCCTGGGTTCAT-3'	0,2 µM
MY-Sonde (Sonde)	5'-[FAM]-CCCATGAAAGACGGTACAAGRTATACTG-[BHQ1] ^b -3'	0,1 µM
^a PCR Produkt = 2 500 – TTGTGCAAATCCTGAGACTCATCAAACCCATGAAAGACGGTACAAGGTATACTGGAATCCGATCTCTGAAACTT-GACATGAACCCAGGCACTGGTAT – 2596		
^b FAM: 6-Carboxyfluorescein, BHQ1: Black Hole Quencher 1		

5.3 Authentische Reh-DNA-Probe

Diese Probe muss aus rohem Muskelgewebe, das von oberflächlichem intermuskulärem Fett und Bindegewebe befreit worden ist, bestehen. Das Ausgangsmaterial sollte aus geeigneten Referenzmaterialien oder hausintern erarbeiteten Materialien stammen, die durch geeignete Fleischbestimmungsprüfungen, z. B. auf DNA-Sequenzierung basierende Analysen, verifiziert wurden. Gereinigte und quantifizierte, aus dem verifizierten Reh-Muskelgewebe gewonnene genomische DNA mit einem Massenanteil von 100 % muss den empfohlenen Qualitätsmerkmalen entsprechen [3] (d.h. bei spektrophotometrischer Messung einen Wert von ~ 1,8 für das Absorptionsverhältnis A260/A280 und einen Wert von ~ 1,8 bis 2,2 für das Absorptionsverhältnis A260/A230 ergeben).

6 Gerät

Die Anforderungen an Gerät und Materialien müssen EN ISO 20813 entsprechen. Die im Folgenden beschriebene Ausrüstung ist erforderlich.

6.1 Realtime-PCR-Thermocyclergerät

Für die PCR muss ein Gerät verwendet werden, das die Temperatur-Zeit-Zyklen zur *In-vitro*-Amplifizierung der DNA durchführt. Darüber hinaus muss das Gerät in der Lage sein, fluoreszierende Moleküle bei festgelegten Wellenlängen anzuregen und das vom eingesetzten Fluorophor emittierte Licht ausreichend zu detektieren, um Realtime-PCR-Tests unter Verwendung von Hydrolysesonden durchzuführen.

7 Durchführung

7.1 Herstellung der Prüfmenge/Probe

Die für die DNA-Extraktion verwendete Untersuchungsprobe muss für die Laboratoriumsprobe repräsentativ und homogen sein, z. B. indem die Laboratoriumsprobe zu einer feinen Mischung gemahlen oder homogenisiert wird. Die Prüfmengen-/Probenvorbereitung muss den in EN ISO 21571 beschriebenen allgemeinen Anforderungen und spezifischen Verfahren entsprechen.

7.2 Herstellung von DNA-Extrakten

Die Extraktion, Reinigung und Quantifizierung der DNA aus der Prüfmenge muss den in EN ISO 21571 beschriebenen allgemeinen Anforderungen und Verfahren entsprechen.

Die in EN ISO 21571:2005, Anhang A, beschriebenen Verfahren der DNA-Extraktion werden empfohlen. Das die Analyse durchführende Laboratorium ist dafür verantwortlich sicherzustellen, dass die extrahierte DNA zwecktauglich ist. Wie in 5.3 angegeben, muss jede gereinigte genomische DNA den empfohlenen Qualitätsmerkmalen entsprechen [3].

7.3 Herstellung von Reh- und Säugetier-Kalibrierstandards

Es muss eine geeignete Anzahl an Kalibrierpunkten und Replikaten, die den Bereich der Quantifizierung umfassen, angewendet werden. Ein Beispiel für die Herstellung von Kalibrierstandards ist in Tabelle 3 dargestellt. Eine 5-Punkt- (vierfache) Verdünnungsreihe (S1 bis S5) kann z. B. mit jeweils zwei Replikaten über den Bereich von etwa 1 440 bis 6 Kopien Reh-Genomäquivalente hergestellt werden, wobei eine Reh-Musterfleischmischung³ oder eine Mischung genomischer DNAs als Kalibriermittel eingesetzt wird, siehe Tabelle 3.

Tabelle 3 — Herstellung einer 5-Punkt-Kalibrierkurve mit vierfachen Verdünnungsstufen

Standard	DNA-Konzentration ng/μl	Haploide Genomäquivalente ^a Kopien/μl	Volumen des Standards μl	Volumen des Wassers μl
S1	20	1 440,0	—	0
S2	5	360,0	20 (S1)	60
S3	1,25	90,0	20 (S2)	60
S4	0,312 5	22,5	20 (S3)	60
S5	0,078 13	5,6	20 (S4)	60
^a Genomäquivalente des Kalibrierstandards S1 wurden durch digitale PCR bestimmt (C-Wert für Reh 3,38).				

7.4 PCR-Ansatz

7.4.1 Proben und Kontrollen

Die aus jeder Prüfmenge extrahierte DNA muss in Replikaten analysiert werden, und es müssen PCR-Kontrollen wie in EN ISO 20813 beschrieben verwendet werden.

7.4.2 Reaktionsgemische

Das Verfahren wurde für ein Gesamtvolumen von 25 μl für die Reh-PCR bzw. 25 μl für die Säugetier-PCR entwickelt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 4 angegeben. Die Reagenzien müssen vollständig aufgetaut sein und unmittelbar vor dem Pipettieren vorsichtig gemischt und kurz zentrifugiert werden. Es wird ein PCR-Reagenziengemisch hergestellt, das alle Komponenten außer der Proben-DNA enthält. Die erforderliche Gesamtmenge an hergestelltem PCR-Reagenziengemisch hängt von der Anzahl der durchzuführenden Reaktionen, einschließlich mindestens einer zusätzlichen Reaktion als Pipettierreserve, ab. Die PCR-Tests werden wie folgt angesetzt:

- a) Das PCR-Reagenziengemisch wird gemischt, kurz zentrifugiert, um die Flüssigkeit am Boden des Mikro-Reaktionsgefäßes zu sammeln, und 20 μl werden in die entsprechenden Vertiefungen (Wells) einer PCR-Platte oder in PCR-Gefäße pipettiert.

³ Während des Ringversuchs wurde eine Musterfleischmischung mit einem Massenanteil von 24,8 % Rehfleisch in Schweinefleisch verwendet.