

DIN EN ISO 19020



ICS 07.100.30

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Horizontales Verfahren für den immunenzymatischen Nachweis von
Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln (ISO 19020:2017);
Deutsche Fassung EN ISO 19020:2017**

Microbiology of the food chain –
Horizontal method for the immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins in
foodstuffs (ISO 19020:2017);
German version EN ISO 19020:2017

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale de détection des entérotoxines staphylococciques par test
immuno-enzymatique dans les aliments (ISO 19020:2017);
Version allemande EN ISO 19020:2017

Gesamtumfang 31 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 19020:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ des DIN-Normenausschusses „Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte“ (NAL).

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

ISO 3696	siehe DIN ISO 3696
ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3696, *Wasser für analytische Zwecke — Anforderungen und Prüfungen*

DIN EN ISO 7218, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen*

Deutsche Fassung

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette —
Horizontales Verfahren für den immunenzymatischen
Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in
Lebensmitteln
(ISO 19020:2017)**

Microbiology of the food chain —
Horizontal method for the immunoenzymatic detection
of staphylococcal enterotoxins in foodstuffs
(ISO 19020:2017)

Microbiologie de la chaîne alimentaire —
Méthode horizontale de détection des
entérotoxines staphylococciques par test
immuno-enzymatique dans les aliments
(ISO 19020:2017)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 14. Mai 2017 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, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, 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: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	7
5 Reagenzien	7
6 Geräte	7
7 Probennahme	8
8 Durchführung	8
8.1 Vorbereitung der Prüfmenge	8
8.2 Lagerung der Untersuchungsprobe	9
8.3 Extraktion	9
8.4 Konzentration des Extrakts (vorgeschrieben für Milch und Milchprodukte)	10
8.5 Gewinnung des konzentrierten Extrakts	11
8.6 Lagerung und Schritte vor dem Nachweis	11
8.7 Nachweis	11
8.8 Leistungskriterien	12
9 Qualitätskontrolle	12
10 Angabe der Ergebnisse	12
11 Bestätigung	12
12 Leistungsmerkmale des Verfahrens	12
13 Untersuchungsbericht	15
Anhang A (informativ) Ergebnisse aus Ringversuchen: 2013	16
Anhang B (informativ) Ergebnisse aus Ringversuchen: 2014	22
Anhang C (informativ) Anmerkung zu Fehlerquellen	28
Literaturhinweise	29

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 19020:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, 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 Dezember 2017, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2017 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.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, 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 19020:2017 wurde von CEN als EN ISO 19020:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen 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. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien 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 empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der WTO-Grundsätze zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Europäischen Komitee für Normung (CEN) und dessen Technischen Komitee CEN/TC 275 *Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren*, in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee ISO/TC 34 *Food products*, Unterkomitee SC 9 *Microbiology*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Einleitung

Staphylokokken-Enterotoxine (SEs) sind Proteine, die in Lebensmitteln durch bestimmte Stämme der koagulase-positiven Staphylokokken (CPS, en: coagulase positive staphylococci), vorwiegend *Staphylococcus aureus*, produziert werden können. Diese SEs sind hitze- und säurebeständige Toxine, die Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und Durchfall verursachen, wenn sie aufgenommen wurden. Durch ihre Stabilität können SEs noch vorhanden sein, selbst wenn koagulase-positive Staphylokokken nicht nachgewiesen werden können. Die SEs bestehen aus einer Gruppe von mehr als 20 strukturell verwandten kugelförmigen monomeren Proteinen mit Molekulargewichten von 19 kDa bis 30 kDa [1]. Diese Proteine sind unter verschiedenen Umweltbedingungen, wie etwa Wärmebehandlung, Gefrieren und Veränderungen des pH-Werts, vergleichsweise stabil; außerdem sind sie resistent gegen proteolytischen Abbau. Üblicherweise, und in Abhängigkeit von der Sensibilität der betroffenen Personen, können Nanogramm-Mengen (ng) des Enterotoxins eine Vergiftung mit den oben beschriebenen Symptomen verursachen. Aufgrund des Einflusses von SEs auf die menschliche Gesundheit hat die Europäische Union Gesetze verabschiedet, um den Verbraucherschutz durch die Festlegung mikrobiologischer Kriterien für Lebensmittel, wie etwa die Keimzählung von CPS und den Nachweis von SEs, zu stärken [2].

Für den Nachweis und/oder die Quantifizierung der SEs wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Einige dieser Verfahren basieren auf Enzymimmunoassays (EIA). Andere Verfahren beruhen auf der chemischen Analyse, bei der Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS, en: liquid chromatography with tandem mass spectrometry) zum Nachweis und zur Quantifizierung von SEs genutzt wird. Da sich letztere Verfahren aktuell in Entwicklung befinden, wurden die EIA-Verfahren als Ausgangsbasis für die Normung eines Nachweisverfahrens für SEs gewählt.

Das Ziel ist es, SEs mithilfe von handelsüblichen Testkits nachzuweisen. Dieses Dokument beschreibt die Verfahrensanweisung für die Extraktion von SEs aus Lebensmittelproben. Darüber hinaus wurden die Leistungskriterien der Kits vor der Anwendung an fünf Arten von Lebensmittelmatrizes auf Grundlage der in diesem Dokument festgelegten Kriterien bewertet.

Die Rückmeldungen zu verschiedenen Ausbrüchen von Lebensmittelvergiftungen durch Staphylokokken wurden als Funktion der aufgenommenen Dosen modelliert [3]. Für diesen Zweck wurden Daten aus der Literatur sowie Daten vom Referenzlabor für CPS der Europäischen Union verwendet.

Das Benchmark-Verfahren der Umweltschutzbehörde der USA (US EPA, en: United States Environmental Protection Agency) wurde auf diesen Datensatz angewandt und half, die Benchmark-Dosis (BMD) zu ermitteln [4]. Die BMD ist als die Dosis einer Gefährdung (Staphylokokken-Enterotoxine) definiert, die fähig ist, gesundheitliche Symptome in einem gegebenen Prozentsatz der exponierten Bevölkerung auszulösen. Die untere Grenze der BMD (BMDL, en: BMD lower limit) ist das untere 95%- (oder 90%-)Konfidenzintervall der BMD. Dieser Wert wurde genutzt, um den akzeptablen Wert für die Nachweisgrenze 50 (LOD₅₀, en: limit of detection 50) der verschiedenen handelsüblichen SE-Nachweiskits festzulegen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Screening-Verfahren für den Nachweis der Staphylokokken-Enterotoxine SEA, SEB, SECs, SED und SEE in Lebensmitteln fest. Es besteht aus zwei Hauptschritten: a) Extraktion gefolgt von einer auf dem Dialyseprinzip beruhenden Konzentration, und b) ein immunenzymatischer Nachweis unter Anwendung handelsüblicher Nachweiskits.

Dieses Dokument ist anwendbar für das Screening von Staphylokokken-Enterotoxinen SEA bis SEE in Produkten, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind.

Andere Staphylokokken-Enterotoxine wie z. B. die Arten SEG, SEH, SEI, SER, SES und SET können auch Krankheiten verursachen. Aufgrund fehlender handelsüblicher Nachweiskits behandelt dieses Dokument nur die Typen SEA bis SEE, es kann jedoch vorbehaltlich der Validierung der Methode für andere Typen von Toxinen anwendbar sein.

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 3696, *Water for analytical laboratory use — Specification and test methods*

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten 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

Staphylokokken-Enterotoxin A, B, C, D, E

SEA, SEB, SEC, SED, SEE

Exoprotein SEA, SEB, SEC, SED und SEE, produziert durch enterotoxigene Stämme koagulase-positiver Staphylokokken, vorwiegend *Staphylococcus aureus*, mit einem Molekulargewicht im Bereich von 19 kDa bis 30 kDa

3.2

Spezifität

SP

(en: specificity)

Anzahl der gefundenen negativen Proben geteilt durch die Anzahl der getesteten Blindproben

3.3

Empfindlichkeit

SE

(en: sensitivity)

Anzahl der gefundenen positiven Proben geteilt durch die Anzahl der getesteten Proben bei einer vorgegebenen Kontaminationsstufe

3.4

Nachweisgrenze 50

LOD₅₀

(en: limit of determination 50)

Konzentration (ng SE/g), für die die Nachweiswahrscheinlichkeit 50 % beträgt

3.5

Benchmark-Dosis

BMD

Dosis (z. B. Staphylokokken-Enterotoxine), bei der vorraussichtlich gesundheitliche Symptome in einem bestimmten Prozentsatz der betroffenen Bevölkerung ausgelöst werden

4 Kurzbeschreibung

Dieses Dokument legt ein Verfahren für den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen (SEA bis SEE) in allen Lebensmitteln fest und besteht aus zwei Hauptschritten: a) Extraktion, gefolgt von einer auf dem Dialyseprinzip beruhenden Konzentration, und b) ein immunenzymatischer Nachweis unter Anwendung handelsübliches Nachweiskits.

5 Reagenzien

Es sind nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit zu verwenden, sofern nichts anderes angegeben ist.

5.1 Destilliertes oder entmineralisiertes Wasser oder Wasser gleichwertiger Qualität nach ISO 3696.

5.2 Salzsäure (z. B. Konzentrationen 5N, 1N oder andere Verdünnungen).

5.3 Natriumhydroxid (z. B. Konzentrationen 5N, 1N oder andere Verdünnungen).

5.4 PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, en: phosphate buffered saline), pH-Wert $7,3 \pm 0,2$ [NaCl/Na₂HPO₄: 145 mM/10 mM].

5.5 PEG, (Polyethylenglycol-)Lösung mit einem Molekulargewicht von 20 000 g/mol.

Eine konzentrierte PEG-Lösung wird vorbereitet: 30 g PEG-Pulver werden abgewogen und 70 ml Wasser (5.1) hinzugefügt.

5.6 Elektroden-Reinigungslösung (z. B. Ethanol 70 %).

5.7 Immunenzymatisches Nachweiskit für SEs. Jedes Kit muss die in 8.7 erwähnten Leistungskriterien erfüllen.

6 Geräte

Übliche Geräte eines mikrobiologischen Labors (nach ISO 7218) und insbesondere die folgenden Geräte.

6.1 Mixer.

6.2 Waage.

6.3 Ausrüstung zur Homogenisierung, z. B. Rotations-Homogenisiergerät, Mixer oder Beutelwalkmischer.

Es wird nachdrücklich empfohlen, ein Rotations-Homogenisiergerät zu verwenden, insbesondere für alle Arten von Lebensmitteln, die schwer zu mischen sind, um eine homogene Probe zu erhalten. Wird ein Beutelwalkmischer genutzt, sind nur Beutel ohne Filter zu verwenden.

6.4 Schüttler bei Raumtemperatur, z. B. Orbitalschüttler, Magnetrührer usw.

6.5 pH-Messgerät und Elektrode, z. B. Einstabmesskette.

6.6 Zentrifuge, geeignet für den Betrieb bei mindestens 3 130 g, nach Möglichkeit kühlbar.

6.7 Dialysemembran, molekulare Ausschlussgrenze (MWCO, en: molecular weight cut off) von 6 000 Da bis 8 000 Da.

6.8 Verschlüsse für Dialysemembran.

6.9 Filtermaterial, z. B. Trichter und Watte, Glaswolle usw.

6.10 Flache Ablageschale.

6.11 Kühlschrank ($3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ oder $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$) und Gefrierschrank ($\leq -18\text{ °C}$).

6.12 Laborgeräte aus Glas oder Polypropylen, um die Adsorption von Toxinen zu vermeiden (Trichter, Becherglas, Fläschchen, Zentrifugenröhrchen usw.).

6.13 Geeignete Ausrüstung für das verwendete Nachweiskit, siehe 5.7.

6.14 Wasserbad ($38\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$)

7 Probennahme

Die Probennahme ist kein Bestandteil des in diesem Dokument festgelegten Verfahrens.

8 Durchführung

8.1 Vorbereitung der Prüfmenge

Bei Käse mit Rinde werden rund 10 % aus der Rinde und 90 % aus dem Kern genommen.

Da Enterotoxine heterogen in der Probe verteilt sein können, wird, wenn möglich, die gesamte Probe oder ein repräsentativer Teil davon mit einem Mixer (6.1) gemischt und homogenisiert. 25 g der homogenisierten Probe wird als Prüfmenge verwendet.

Bei einem mutmaßlichen Ausbruch von Lebensmittelvergiftungen durch Staphylokokken (SFPO, en: staphylococcal food poisoning outbreak) darf die Untersuchungsprobengröße unter 25 g liegen. Die Untersuchung wird wie unten beschrieben durchgeführt und die Schritte 8.3.1 bis 8.5.2 werden entsprechend angepasst. Das Verhältnis des Gewichts der Prüfmenge zu dem konzentrierten Extrakt (8.5.2) sollte etwa fünf sein [z. B. 25 g Prüfmenge für 5,0 g bis 5,5 g (höchstens 5,8 g für klebrige Extrakte) des konzentrierten Extrakts, 12,5 g Prüfmenge für 2,5 g bis 2,8 g (höchstens 2,9 g für klebrige Extrakte) des konzentrierten Extrakts].