

DIN EN 15633-1

ICS 67.050

Einsprüche bis 2018-06-20
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 15633-1:2009-04

Entwurf

**Lebensmittel –
Nachweis von Lebensmittelallergenen mit immunologischen Verfahren –
Teil 1: Allgemeine Betrachtungen;
Deutsche und Englische Fassung prEN 15633-1:2018**

Foodstuffs –
Detection of food allergens by immunological methods –
Part 1: General considerations;
German and English version prEN 15633-1:2018

Produits alimentaires –
Méthodes d'analyse immunologiques pour la détection des allergènes alimentaires –
Partie 1: Considérations générales;
Version allemande et anglaise prEN 15633-1:2018

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 34 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15633-1:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche/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 15633-1:2009-04 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Überarbeitung des Abschnitts 3 „Begriffe“;
- b) Ergänzungen und detailliertere Beschreibungen der Abschnitte 5 „Durchführung“, 6 „Auswertung und Angabe der Ergebnisse“ und 7 „Spezifische Parameter, die die Ergebnisse beeinflussen können“;
- c) Norm redaktionell überarbeitet.

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

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

Foodstuffs — Detection of food allergens by immunological 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	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
3.1 Allgemeine Begriffe	5
3.2 Antikörperbezogene Begriffe	6
3.3 Verfahrenbezogene Begriffe	7
4 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien	8
4.1 Kurzbeschreibung	8
4.2 Geräte und Ausrüstungen	8
4.3 Material und Reagenzien	9
5 Durchführung	9
5.1 Allgemeines	9
5.2 Herstellung der Probe	9
5.3 Extraktion	10
5.4 Kalibrierkurven	10
5.4.1 ELISAs	10
5.4.2 Durchflussprüfungen	10
5.5 Durchführung	11
6 Auswertung und Angabe der Ergebnisse	11
6.1 Allgemeine Bemerkungen	11
6.2 Quantitative Ergebnisse	12
6.3 Qualitative Ergebnisse	13
6.4 Unklare Ergebnisse	13
7 Spezifische Parameter, die die Ergebnisse beeinflussen können	14
7.1 Allgemeines	14
7.2 Nachweisgrenze	14
7.3 Matrices	14
7.4 Extraktionseffizienz	15
7.5 Standardkurven	15
7.6 Umrechnungsfaktor und Einheiten	15
7.7 Kreuzreaktivität	15
8 Untersuchungsbericht	15
Literaturhinweise	16

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 15633-1:2018) 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 15633-1:2009 ersetzen.

Einleitung

Ein spezifisches Protein oder eine Gruppe von Proteinen oder Peptiden, die aus diesen Proteinen stammen, kann als Marker für das Vorliegen von Lebensmitteln oder Lebensmittelzutaten, die allergische Reaktionen hervorrufen, dienen. Diese Europäische Norm beschreibt ein Verfahren zum qualitativen Nachweis und/oder zur quantitativen Bestimmung von aus Proteinen gewonnenen Analyten oder Proteinen/Peptiden oder proteinartigen Einheiten als Marker für potenziell allergene Inhaltsstoffe oder Bestandteile. Dies geschieht durch Analyse des Proteins, das aus der zu testenden Probe extrahiert wurde. In jedem Verfahren sind geeignete Methoden für die Extraktion des Proteins enthalten. Der Schwerpunkt dieser Europäischen Norm liegt auf antikörper-basierten Verfahren, bei denen ein Protein oder eine für diese Allergenquelle repräsentative Gruppe von Proteinen oder Peptiden (die von diesen Proteinen stammen), qualitativ oder quantitativ bestimmt wird.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm stellt Gesamtrahmen für die qualitativen und quantitativen Verfahren zur Bestimmung von Lebensmittelallergenen und allergenen Inhaltsstoffen unter Anwendung von auf Antikörpern basierenden Verfahren in Lebensmitteln zur Verfügung. Diese Europäische Norm legt die allgemeinen Leitlinien und Leistungskriterien für auf Antikörpern basierende Verfahren zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Proteinen fest, die als Marker für das Vorliegen von allergieauslösenden Lebensmitteln oder Lebensmittelzutaten dienen. Auch mit anderen als den beschriebenen Verfahren können die Proteine nachgewiesen und identifiziert werden. Die in dieser Norm angeführten Leitlinien, Mindestanforderungen und Leistungskriterien sind dafür vorgesehen, sicherzustellen, dass von verschiedenen Analytikern in Lebensmittelbetrieben und -laboratorien vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden.

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 Allgemeine Begriffe

3.1.1

Denaturierung von Proteinen

Behandlung (ob thermisch, chemisch, enzymatisch oder anderweitig), die die Konformation von Proteinen (d.h. die sekundäre, tertiäre und quaternäre Struktur) so weit beeinflusst, dass nur die Primärstruktur oder Teile davon erhalten bleiben (entweder intakt, fragmentiert oder hydrolysiert)

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei der Denaturierung können zuweilen die funktionellen, enzymatischen oder Antigen-Eigenschaften des Proteins modifiziert werden.

3.1.2

Vernetzung von Proteinen

chemische Reaktion und/oder physikalische Wechselwirkung zwischen Proteinen

Anmerkung 1 zum Begriff: Durch die Vernetzung kann die Extraktionsfähigkeit eines Proteins in einer Lebensmittelmatrix verändert werden.

3.2 Antikörperbezogene Begriffe

3.2.1

Antikörper

Protein (Immunglobulin), das als Antwort auf ein als fremd erkanntes Molekül (Antigen) von B-Lymphozyten produziert und abgesondert wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Antikörper ist in der Lage, dieses spezifische Antigen oder verwandte Peptidstrukturen, z. B. Epitope, zu binden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Das Antigen löst eine Immunantwort aus.

[QUELLE: EN ISO 21572:2013, modifiziert – informativer Teil der Definition wurde in Anmerkung 1 übertragen und Anmerkung 2 wurde ergänzt]

3.2.2

Antigen

Substanz, die von einem Antikörper erkannt wird (d. h. die Substanz, die vom Immunsystem als „fremd“ erkannt wird und eine Immunantwort auslöst)

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Antigen reagiert *in vivo* und *in vitro* spezifisch mit den erzeugten Antikörpern.

Anmerkung 2 zum Begriff: Das Antigen löst eine Immunantwort aus.

3.2.3

Allergen

Antigen, das eine Immunglobulin-E-vermittelte allergische Reaktion auslöst (außer Gluten)

Anmerkung 1 zum Begriff: Ein Allergen im Rahmen dieser Norm ist proteinhaltiger Natur.

3.2.4

Klon

Population von identischen Zellen, abgeleitet von einer individuellen Zelle

[QUELLE: EN ISO 21572:2013]

3.2.5

monoklonaler Antikörper

Antikörper, der aus einem einzelnen Hybridomklon hergestellt und auf ein einzelnes Epitop auf dem Antigen gerichtet ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Aus einem B-Zell-Klon hergestellter Antikörper mit identischen physikalischen, biochemischen und immunologischen Eigenschaften

3.2.6

polyklonale Antikörper

Antikörper, die von mehreren B-Zellen produziert werden, die verschiedene Epitope desselben Antigens erkennen

3.2.7

Spezifität eines Antikörpers

Fähigkeit eines Antikörpers, sich spezifisch an ein bestimmtes Antigenepitop und nicht an andere ähnliche Strukturen auf demselben oder anderen Antigenen zu binden

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Fähigkeit von Antikörpern, verwandte Strukturen zu erkennen und zu unterscheiden.

3.2.8

Kreuzreaktivität

Bindung des Antikörpers an eine Substanz, die nicht der hauptsächlich interessierende Analyt ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Fähigkeit von Antikörpern, an ähnliche Epitope zu binden, die auf unterschiedlichen Antigenen liegen.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Reaktion eines Antikörpers mit einem anderen Antigen als dem, das für die Immunisierung verwendet wurde.

[QUELLE: EN ISO 21572:2013, modifiziert — Anmerkungen 1 und 2 wurden ergänzt]

3.2.9

Epitop

Bereich eines Antigens (z. B. lineare Sequenz oder Konformation), der von einem Antikörper oder von Rezeptoren auf Zellen spezifisch erkannt wird.

3.2.10

Konjugat

Material, das durch Verknüpfung von zwei oder mehr Substanzen hergestellt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Konjugate von Antikörpern/Proteinen mit Fluorochromen (z. B. Farbpartikeln), Goldnanopartikeln, radioaktiv markierte Substanzen oder Enzymen werden häufig in Immunoassays verwendet.

Anmerkung 2 zum Begriff: Ein Konjugat (einschließlich konjugierter Antikörper) ist ein Antikörper oder eine Substanz (z. B. Avidin), welche/r mit einer Reportereinheit wie einem Enzym, Fluorochrom, radioaktiven oder festen Teilchen verbunden ist, wodurch ein nachweisbares Signal erzeugt werden kann. Enzymgebundene Konjugate erfordern die Zugabe spezifischer Substrate, um messbare (z. B. farbige) Reaktionsprodukte zu bilden.

3.3 Verfahrenbezogene Begriffe

3.3.1

Immunblotting

Übertragung von Proteinen (d. h. des interessierenden Proteins) nach elektrophoretischer Trennung auf eine bindende Oberfläche (Membran) und Visualisierung des Antigens oder der Antigene mit einem spezifischen Antikörper-Reporter-Konjugat

Anmerkung 1 zum Begriff: Transfer von elektrophoretisch getrennten Proteinen auf eine Polymerfolie oder Nitrocellulosemembran.

Anmerkung 2 zum Begriff: Dieser Begriff wird in dieser Norm nicht weiter ausgeführt.

3.3.2

enzymgebundener Immunosorbent-Test

ELISA

in-vitro-Test zum Nachweis von Antigenen, der enzymatisch gebundene Antikörper (oder Antigene) und ein spezifisches Substrat kombiniert, um ein farbiges oder fluoreszierendes Reaktionsprodukt zu bilden.

Anmerkung 1 zum Begriff: Je nach Anwendung kann dieser Test für qualitative oder quantitative Zwecke eingesetzt werden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Der ELISA-Test wird üblicherweise als mikrotiterplattenbasiertes Verfahren durchgeführt (z. B. Sandwich, Competitive).

3.3.3

schnelle Immunoassay-Formate

schnelle Immunoassay-Formate, einschließlich Lateral Flow Devices (LFDs), Dip Sticks (d. h. Immunosticks) und Flow-Through Devices, bei denen entweder die Antikörper oder die Antigene auf eine feste Oberfläche aufgetragen werden.

Anmerkung 1 zum Begriff: Chromatographie bezieht sich auf den Transport der Probe oder anderer Lösungen in lateraler Richtung auf einer Membran oder vertikal durch eine Membran. Bei einem Lateral Flow Gerät oder einem Peilstab erfolgt der Transport von der Probenaufgabe zu einem Detektionspunkt. Bei Durchflussgeräten sind Probenaufragspunkt und Detektionspunkt identisch.

Anmerkung 2 zum Begriff: Schnelle Immunoassay-Formate können qualitative, semi-quantitative oder quantitative Test-Designs umfassen, bei denen Antikörper oder Antigene auf einen festen Stick aufgetragen werden, der in einem unbeschichteten Röhrchen/Küvette verwendet wird.

3.3.4

Rocket-Immunelektrophorese

RIE

in-vitro-Test, bei dem das Antigen elektrophoretisch in einem antikörperhaltigen Gel bewegt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Die bis zum Eintreten der Äquivalenz zwischen dem Antigen und dem entsprechenden Antikörperkonzentrationen gebildeten Präzipitationszonen sind raketenförmig.

Anmerkung 2 zum Begriff: Dieser Begriff wird in dieser Norm nicht weiter ausgeführt.

3.3.5

Protein-Mikrochip

Antikörper-(Mikro- oder Nano-)chip

miniaturisierte und automatisierte Vorrichtung zum Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Antigen und Antikörper

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Chip kann aus mehreren punktförmigen Stellen mit verschiedenen immobilisierten Antigenen oder Antikörpern bestehen, die an den inneren Teil einer Reaktionskammer oder an der Oberfläche des Objektträgers gebunden sind und die die gleichzeitige Erkennung und quantitative Bestimmung von Antigenen oder Antikörpern ermöglichen.

Anmerkung 2 zum Begriff: Dieser Begriff wird in dieser Norm nicht weiter ausgeführt.

4 Allgemeine Anforderungen an Laboratorien

4.1 Kurzbeschreibung

Aus einer Probe wird nach einem matrixspezifischen Verfahren oder einer allgemeinen Methode der Zielanalyt/das Antigen (proteinartig) extrahiert und mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen oder polyclonalen Antikörpers die Konzentration des Zielanalyten in der Probe qualitativ nachgewiesen oder quantitativ gemessen.

4.2 Geräte und Ausrüstungen

Im Labor sollten ordnungsgemäß gewartete Ausrüstungen verwendet werden, die für die angewendeten Verfahren geeignet sind, z. B. in Übereinstimmung mit den in EN ISO/IEC 17025 dargelegten Anforderungen. Außer der laborüblichen Grundausstattung werden zusätzlich benötigte Geräte in den spezifischen Verfahren beschrieben.

Geräte und Ausrüstungen müssen nach den Anweisungen des Herstellers gewartet werden. Kalibriersysteme müssen zur Verfügung stehen, um eine routinemäßige Kalibrierung der Ausrüstungen zu ermöglichen.

4.3 Material und Reagenzien

Falls nicht anders angegeben, werden für die Analyse nur Reagenzien von anerkannter Analysenreinheit und nur deionisiertes, destilliertes, gereinigtes oder gleichwertiges Wasser verwendet. Andere Reagenzien, wie z. B. Antikörper, konjugierte Antikörper/Antigene, Substrat, Stopplösungen und Pufferbestandteile sind verfahrensspezifisch. Besonderheiten in Bezug auf Reagenzien wie Standards, Referenzmaterial, auf einer festen Oberfläche gebundene oder freie gelöste Antikörper, Kontrollen und Proben sind im betreffenden Verfahren beschrieben. Die Lagerbedingungen und Haltbarkeitsdauer der Reagenzien sollten im Untersuchungsbericht deutlich angegeben sein.

5 Durchführung

5.1 Allgemeines

Bei der Anwendung dieser Europäischen Norm müssen die allgemeinen Qualitätssicherungsaufgaben für Laboratorien (z. B. hinsichtlich der Kalibrierung der Geräte, hinsichtlich der Probenextraktion und Wiederholungsuntersuchungen, der Blindproben, der Verwendung von Referenzmaterialien, der Erstellung von Kalibrierkurven usw.) befolgt werden. Alle Geräte, die in direkten Kontakt mit der Probe kommen, werden zur Vermeidung von Kreuzkontamination gründlich gereinigt. Der Anwendungsbereich des Verfahrens, einschließlich der Eignung für Matrices, muss eindeutig festgelegt sein.

Vor der Durchführung einer Lebensmittelallergenanalyse sollten besondere Überlegungen angestellt werden:

- a) das Laborlayout (z. B. sollte die Extraktion räumlich von der Detektion getrennt sein);
- b) den aktuellen Arbeitsablauf (z. B. andere Tätigkeiten in den Labors, die das Potenzial für Kreuzkontaminationen erhöhen können);
- c) behandelte Probenotypen (z. B. können Kreuzkontaminationsprobleme die Fähigkeit, Analysen zuverlässig durchzuführen, beeinträchtigen);
- d) Geräte in den Laboratorien (z. B. sollten gemeinsame Geräte und Ausrüstungen vermieden werden, soweit es möglich ist sollten fest zugeordnete Geräte und Ausrüstungen verwendet werden);
- e) Behälter (z. B. sind Einweg-Verbrauchsmaterialien vorzuziehen) sowie;
- f) allgemeine hauswirtschaftliche Aufgaben (z. B. sollte das Waschen von Laborartikeln und die Reinigung von Oberflächen routinemäßig validiert und verifiziert werden).

5.2 Herstellung der Probe

Abhängig davon, welche Probenotypen routinemäßig analysiert werden, sollten im Labor geeignete Geräte zum Walzen, Zerkleinern, Mahlen und Mischen zur Verfügung stehen. Die Probenvorbereitung ist ein kritischer Schritt bei der Analyse von Lebensmittelallergenen, mit dem Ziel, eine homogene und repräsentative Probe der ursprünglichen Probenpartie bereitzustellen, um zuverlässige Ergebnisse zu gewährleisten. Probenvorbereitungsverfahren sollten immer validiert werden, um ihre Wirksamkeit zu gewährleisten. Einige Proben erfordern keine Vorbereitung (z. B. Wein, Oberflächenabstriche, Spülwasser), andere erfordern spezielle validierte Verfahren (z. B. Stoffmuster von Berufsbekleidung). Um Hinweise über geeignete Verfahren zu erhalten, sollten die Hersteller der Testkits konsultiert werden.

Leistungsüberwachungen des Verfahrens zur Bestimmung von Wiederfindungsraten, Matrixeffekten usw. beinhalten oft das „Dotieren“ (bzw. Aufstocken) von Proben mit bekannten Mengen des gemessenen Allergens. Vorzugsweise werden eingesandte Kontrollproben verwendet, die ein Material enthalten, welches durch Dotieren mit dem entsprechenden Allergen hergestellt wurde, bevor die Produkte in einer Weise hergestellt bzw. verarbeitet werden, die mit den zu analysierenden Testproben vergleichbar ist. Wenn