

DIN EN ISO 19020



ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2016-10-26

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Horizontales Verfahren für den immunenzymatischen Nachweis von
Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln;
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 19020:2016**

Microbiology of food chain –
Horizontal method for the immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins in
foodstuffs;

German and English version prEN ISO 19020:2016

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Méthode horizontale de détection des entérotoxines staphylococciques par test
immuno-enzymatique dans les aliments;
Version allemande et anglaise prEN ISO 19020:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-08-26 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 des 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 60 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 19020:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom 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).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN ISO 19020 beigefügt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierte internationale Norm wird im Folgenden auf die entsprechende Deutsche Norm hingewiesen:

ISO 3696	siehe DIN ISO 3696
ISO 16140-1	siehe DIN EN ISO 16140-1
ISO/CD 16140-3	siehe DIN EN ISO 16140-3

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 16140-1, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Validierung — Teil 1: Terminologie*

DIN EN ISO 16140-3, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Validierung — Teil 3: Arbeitsvorschrift für die Prüfung von Referenz- und alternativer Verfahren in einem einzelnen Labor*

Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für den immunenzymatischen Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen in Lebensmitteln (ISO/DIS 19020:2016)

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale de détection des entérotoxines staphylococciques par test immuno-enzymatique dans les aliments (ISO/DIS 19020:2016)

Microbiology of food chain — Horizontal method for the immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins in foodstuffs (ISO/DIS 19020:2016)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

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 Probenahme	8
8 Prüfverfahren	8
8.1 Lagerung der Untersuchungsprobe	8
8.2 Vorbereitung der Einwaage	8
8.3 Extraktion	9
8.4 Konzentration des Extrakts (vorgeschrieben für Milch und Milchprodukte)	10
8.5 Ausbeute des konzentrierten Extrakts	10
8.6 Lagerung	11
8.7 Nachweis	11
9 Qualitätskontrolle	12
10 Angabe der Ergebnisse	12
11 Bestätigung	12
12 Leistungsmerkmale des Verfahrens	12
13 Untersuchungsbericht	15
Anhang A (informativ) Ergebnisse der Ringversuche - 2013	16
Anhang B (informativ) Ergebnisse von Ringversuchen - 2014	22
Anhang C (informativ) Anmerkung zu Störungen	32
Literaturverzeichnis	33

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 19020:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 19020:2016 wurde vom CEN als prEN ISO 19020:2016 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 der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

ISO 19020 wurde vom Europäischen Komitee für Normung (CEN), in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, nach der Vereinbarung über fachliche 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), hauptsächlich *Staphylococcus aureus*, produziert werden. 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 einem Molekulargewicht von 19 kDa bis 30 kDa^[1]. Diese Proteine sind relativ stabil unter verschiedenen Umweltbedingungen wie etwa Wärmebehandlung, Gefrieren und pH-Wert; außerdem sind sie resistent gegen proteolytischen Abbau. Normalerweise und in Abhängigkeit von der Sensibilität der betroffenen Personen können Nanogramm-Mengen (ng) des Enterotoxins eine Vergiftung mit den oben beschriebenen Symptomen verursachen. Daher hat die EU eine Rechtsvorschrift erlassen, um dieses Problem anzugehen und um den Schutz der Konsumenten durch definierte mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, wie z. B. eine CPS-Keimzahlbestimmung und einen Nachweis der SEs^[2], zu erhöhen.

Verschiedene Verfahren wurden für den Nachweis und/oder die Bestimmung der SEs entwickelt. Einige dieser Verfahren sind Verfahren, die auf Enzymimmunoassays (EIA) beruhen. Andere Verfahren beruhen auf der chemischen Analyse, die Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) zum Nachweis und zur Bestimmung der Toxine^[5] nutzt. Da diese Verfahren aktuell in der Entwicklung sind, wurden daher die EIA-Verfahren als Ausgangspunkt für die Normung eines Nachweisverfahrens für SEs ausgewählt.

Das Ziel ist es, SEs mithilfe von handelsüblichen Testkits nachzuweisen. Um das Testkit nutzen zu können, muss die Leistung des Kits an fünf Arten von Lebensmittelmatrizen bewertet werden, bevor sie nach den in dieser Norm festgelegten Kriterien eingesetzt werden.

Die Rückmeldungen der verschiedenen Ausbrüche von Lebensmittelvergiftungen durch Staphylokokken wurden als Funktion der eingenommenen Menge^[4] modelliert. 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) wurde auf diesen Datensatz angewandt und hilft, die Benchmark-Dosis (BMD)^[3] zu bestimmen. Die BMD ist als die Dosis einer Gefährdung (Staphylokokken-Enterotoxine) definiert, die fähig ist, gesundheitliche Symptome in einem gegebenen Prozentsatz der ausgesetzten Grundgesamtheit 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 zufriedenstellend die Nachweisgrenze 50 (LOD₅₀) der verschiedenen handelsüblichen SE-Nachweiskits anzugeben.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Screening-Verfahren für den Nachweis von den Staphylokokken-Enterotoxinen SEA, SEB, SECs, SED und SEE (SEA bis SEE) in Lebensmitteln fest. Die Norm besteht aus zwei Hauptschritten (i) die Extraktion gefolgt von der Konzentration, was auf dem Dialyseprinzip beruht und (ii) ein immunenzymatischer Nachweis unter Anwendung handelsüblicher Nachweiskits.

Diese Internationale Norm ist anwendbar für das Screening von Staphylokokken-Enterotoxinen (SEA-SEE) in Produkten bestimmt für den menschlichen Verzehr.

Andere Staphylokokken-Enterotoxine, wie z. B. die Arten SEG, SEH, SEI, SER, SES und SET, können auch Krankheiten verursachen. Doch aufgrund fehlender handelsüblicher Nachweiskits richtet sich diese Norm nur an die Arten SEA bis SEE.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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 16140-1, *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 1: Vocabulary*

ISO/AWI 16140-3, *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference and alternative methods implemented in a single laboratory*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe nach ISO 16140-1.

3.1

SE: Staphylokokken-Enterotoxin

Protein mit einem Molekulargewicht im Bereich von 19 kDa bis 30 kDa, das durch enterotoxische Stämme der koagulase-positiven Staphylokokken, hauptsächlich *Staphylococcus aureus*, produziert wird

3.2

rSP: relative Spezifität

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

3.3

rSE: relative Sensibilität

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

3.4

LOD₅₀: Nachweisgrenze 50 (en: limit of detection)

Konzentration (ng SE/g) bei einer 50%igen Nachweiswahrscheinlichkeit

3.5

BMD: Benchmark-Dosis

eine Dosis, die eine zu erwartende negative Reaktion (der sogenannten Benchmark-Response) unter Berücksichtigung des Hintergrundrauschens hervorruft

4 Kurzbeschreibung

Dieses Dokument legt ein Verfahren für den Nachweis von Staphylokokken-Enterotoxinen (SEA-SEE) in allen Lebensmitteln fest und besteht aus den zwei Hauptschritten (i) die Extraktion gefolgt von einer auf dem Dialyseprinzip beruhenden Anreicherung und (ii) ein immunenzymatischer Nachweis unter Anwendung handelsüblicher 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-Puffer (phosphatgepufferte Kochsalzlösung, en: Phosphate Buffer Saline), pH $7,3 \pm 0,2$ (NaCl/Na₂HPO₄: 145 mM/10 mM).

5.5 Polyethylenglykol 20000 (PEG), Qualität zur Synthese.

Je Probe werden 100 ml PEG-Lösung vorbereitet: 30 g PEG-Pulver werden abgewogen und 70 ml Wasser (5.1) hinzugefügt.

5.6 Waschlösung der Elektrode (z. B.: Ethanol 70 %).

5.7 Immunenzymatische Nachweiskits bestimmt für SEs. Diese Kits müssen die Leistungskriterien, die in dieser Norm in Abschnitt 8.7 erwähnt sind, erfüllen.

6 Geräte

Übliche Laborgeräte und insbesondere Folgendes.

6.1 Mixer.

6.2 Waage.

6.3 Homogenisierungsgerät (z. B.: ultra-Turrax®, Mixer oder Stomacher).

Es wird nachdrücklich empfohlen, einen ultra-Turrax® zu verwenden, insbesondere für alle Arten von Lebensmitteln, die schwer zu mischen sind, um eine homogene Probe zu erhalten. Wird ein Stomacher genutzt, werden nur Beutel ohne Filter verwendet.

6.4 Schüttler bei Raumtemperatur (z. B.: Orbitalschüttler, magnetisches Rührwerkzeug...).

6.5 pH-Messgerät und Elektrode (z. B.: Einstabmesskette).

6.6 Zentrifuge (geeignet für den Betrieb bei mindestens 3 130 g, wenn möglich, imstande gekühlt zu werden).

6.7 Dialysemembran, MWCO: 6 000 Da bis 8 000 Da (z. B.: Spectra/Por®¹⁾).

6.8 Verschlüsse (z. B.: Spectra/Por®).

6.9 Filtermaterial (z. B.: Trichter und Watte, Glaswolle...).

6.10 Behälter.

6.11 Kühltisch ($5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$) und Tiefkühler ($\leq -18\text{ °C}$).

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

6.13 Geeignete Ausrüstung für das verwendete Nachweiskit (siehe 5.7).

7 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in dieser Internationalen Norm beschriebenen Verfahrens.

8 Prüfverfahren

8.1 Lagerung der Untersuchungsprobe

Es wird empfohlen, die Proben vor der Untersuchung bei $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ zu lagern.

Wenn die Untersuchung nicht innerhalb von 24 h durchgeführt wird, können die Proben eingefroren werden. In diesem Fall ist darauf zu achten, dass die Proben vor Beginn der Untersuchung bei $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ vollständig aufgetaut werden.

Um einen Verlust der Toxine zu vermeiden, wird dringend empfohlen, die Proben nicht wiederholt vor der Untersuchung einzufrieren und aufzutauen.

8.2 Vorbereitung der Einwaage

Bei Käse mit Rinde wird rund 10 % der Rinde und 90 % des Kerns genommen.

Da Enterotoxine heterogen in der Probe verteilt sein können, wird, wenn möglich, die gesamte Probe oder ein repräsentativer Teil davon mit einem Mixer (6.3) gemischt und homogenisiert. 25 g der homogenisierten Probe wird als Einwaage verwendet.

Bei einem mutmaßlichen Ausbruch einer Lebensmittelvergiftung durch Staphylokokken (SFPO, en: staphylococcal food poisoning outbreak) könnte die Untersuchungsprobe unter 25 g liegen. Die Untersuchung wird, wie oben beschrieben, durchgeführt und alle Schritte werden angepasst, um ein Verhältnis gleich 5 zu berücksichtigen (z. B.: 25 g Einwaage für 5 g konzentrierten Extrakt, 12,5 g Einwaage für 2,5 g konzentrierten Extrakt...). Die Untersuchung kann nicht durchgeführt werden, wenn die Probemenge unter 12,5 g liegt.

1) Beispiel eines passenden Produkts, das im Handel erhältlich ist. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und stellt keine Anerkennung dieses Produkts durch ISO dar.

8.3 Extraktion

8.3.1 Es werden ungefähr 40 ml destilliertes Wasser (5.1) bei $38\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ zur Einwaage gegeben. Die Mischung wird mithilfe eines ultra-Turrax®²⁾ oder eines Mixers (5.3) homogenisiert. Dieser Schritt ist besonders wichtig bei Produkten mit einem hohen Fettgehalt. Es wird empfohlen, einen ultra-Turrax® für alle Arten der Lebensmittelproben, die schwer zu mixen sind, zu verwenden, um eine homogene Probe erhalten.

Bei einem flüssigen Produkt wird kein Wasser hinzugefügt und direkt wie in 8.3.2 beschrieben vorgegangen.

8.3.2 Die gesamte Probe wird wiedergewonnen und das System (Schaft des ultra-Turrax®, der Stomacher-Beutel oder der Behälter des Mixers) wird mit einem minimalen Volumen an destilliertem Wasser (5.1) gespült.

ANMERKUNG Je größer das Volumen der genutzten Flüssigkeit, desto länger wird die Länge der (des) Dialysemembran(schlauchs) benötigt.

8.3.3 Durch Schütteln der Probe (6.4) bei Raumtemperatur (18 °C bis 27 °C) für mindestens 30 min wird den Toxinen ermöglicht, sich in der Probe zu verteilen.

8.3.4 Die Mischung wird mit einer geeigneten Salzsäurelösung (5.2) angesäuert, um einen pH-Wert zwischen 3,5 und 4,0 zu erhalten, gemessen mit einem pH-Messgerät (6.5).

8.3.5 Die gesamte Mischung wird mindestens bei 3 130 g für 15 min bei etwa 4 °C oder bei Raumtemperatur (18 °C bis 27 °C) (6.6) zentrifugiert.

Bei Fettproben wird das Zentrifugieren bei kalter Temperatur (etwa 4 °C) empfohlen, um die Fettteilchen vor der Dialyse zu beseitigen.

8.3.6 Der Überstand wird in einem Becherglas (6.12) aufgenommen. Wenn der Überstand nicht klar genug ist, wird er erneut wie in 8.3.5 beschrieben zentrifugiert. Der pH-Wert muss zwischen 3,0 und 4,5 liegen.

Ist der pH-Wert $> 4,5$, wird wie in 8.3.4 beschrieben vorgegangen.

Ist der pH-Wert $< 3,0$, kann die 3D-Struktur der SEs beschädigt werden; es wird eine weitere Einwaage von 25 g genommen und wie in 8.3.1 beschrieben vorgegangen.

8.3.7 Die Mischung wird mit den geeigneten Natronlaugen (5.3) neutralisiert, um einen pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 zu erhalten.

Ist der pH-Wert $> 9,0$, könnte die 3D-Struktur der SEs beschädigt werden; es wird eine weitere Einwaage von 25 g genommen und wie in 8.3.1 beschrieben vorgegangen.

8.3.8 Es wird wieder nach 8.3.5 zentrifugiert.

8.3.9 Die gesamte neutralisierte wässrige Phase wird für den Konzentrationsschritt aufgenommen.

Um die Höchstmenge an Toxinen zu erhalten, werden die Elektrode und das Becherglas nach den Schritten der Ansäuerung und der Neutralisation mit einigen Tropfen destilliertem Wasser (5.1) gespült.

Bei Proben mit einem hohen Fettgehalt kann die Elektrode mit Ethanol 70 % (5.6) gesäubert werden, um die Fettteilchen nach der vollständigen Untersuchung zu lösen.

2) Beispiel eines passenden Produkts, das im Handel erhältlich ist. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und stellt keine Anerkennung dieses Produkts durch ISO dar.

8.3.10 Alternatives Extraktionsverfahren (optional).

Dieses alternative Verfahren kann nur in besonderen Fällen, wie einer mutmaßlichen Lebensmittelvergiftung, genutzt werden und kann nicht für Milch und Milchprodukte angewendet werden. Dieses alternative Verfahren unterscheidet sich von dem beschriebenen Verfahren darin, dass der Dialysekonzentrationsschritt weggelassen wird. In diesem Verfahren führt das Labor die Extraktion wie in 8.3.1 bis 8.3.9 beschrieben durch und setzt direkt das Nachweisverfahren (8.7) immunologisch basierter Methoden nach Herstellerangaben ein:

- Die Extraktion wird wie in 8.3.1 bis 8.3.9 beschrieben durchgeführt.
- Das notwendige Volumen (abhängig vom verwendeten Kit) der neutralisierten wässrigen Phase (8.3.9) wird genommen und diese nicht aufkonzentrierte Probe wird untersucht. Die restliche neutralisierte wässrige Phase muss bei $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ gelagert werden.
- Bei einem negativen Ergebnis, muss am gleichen Tag der Konzentrationsschritt mit der restlichen neutralisierten wässrigen Phase begonnen werden, wie in 8.4 beschrieben.

Falls dieses Verfahren nicht streng befolgt wird, sollte eine neue Einwaage untersucht werden. Es wird nachdrücklich empfohlen, das Verfahren zur Hauptextraktion durchzuführen, wenn die Probengröße nahe bei 25 g liegt.

8.4 Konzentration des Extrakts (vorgeschrieben für Milch und Milchprodukte)

8.4.1 Für jede Probe wird die nach 5.5 vorbereitete PEG-Lösung verwendet.

8.4.2 Je zu untersuchender Probe werden etwa 50 cm bis 60 cm einer Dialysemembran (6.7) abgeschnitten.

8.4.3 Die Membran wird zur Rehydration (5.1) in Wasser eingeweicht, wobei die Anweisungen des Herstellers befolgt werden (z. B.: für mindestens 30 min bei Raumtemperatur).

Vor der Anwendung wird die Membran (außen und Innenteile) mit Wasser (5.1) gespült.

8.4.4 Ein Ende der Membran wird verschlossen (6.8).

8.4.5 Um Schwebstoffe auszusondern wird die vorbereitete Membran mit der kompletten überstehenden Flüssigkeit (8.3.9) mithilfe eines Trichters oder eines kleinen Stücks Filtermaterial (6.9) gefüllt. Das andere Ende der Membran wird mit einem zweiten Verschluss (6.8) verschlossen.

8.4.6 Die gefüllte Dialysemembran wird in einen Behälter (6.10) gelegt, der mit PEG-Lösung (8.4.1) gefüllt ist.

8.4.7 Man lässt die Extrakte über Nacht bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ (6.11) aufkonzentrieren. Wenn der Extrakt nicht ausreichend konzentriert ist, wird er länger (bis zu 3 Tagen) in die PEG-Lösung gelegt oder es wird etwas PEG-Pulver hinzugefügt.

8.5 Ausbeute des konzentrierten Extrakts

8.5.1 Die Dialysemembran wird aus der PEG-Lösung genommen und die Außenteile der Membran werden mit Wasser (5.1) gespült, um alle Spuren der PEG-Lösung zu entfernen.

8.5.2 Ein Ende der Membran wird geöffnet und der konzentrierte Extrakt wird gewonnen und der Innenteil der Dialysemembran wird gründlich gespült mithilfe:

- PBS (5.4) bei Milch und Milchprodukten;

— Wasser (5.1) bei anderen Matrizen.

Die Innenteile der Dialysemembran werden gründlich gereinigt, um einen endkonzentrierten Extrakt mit einer Masse im Bereich von 5,0 g bis 5,5 g (maximal 5,8 g für klebrige Extrakte) zu erhalten.

Der konzentrierte Extrakt wird vorsichtig in ein Glas oder eine Polypropylen-Ampulle (6.12) überführt.

Während dieses kritischen Schritts wird Folgendes empfohlen, um eine maximale Ausbeute an Enterotoxinen zu erhalten:

- die Innenteile der Dialysemembran (ein Teil an dem anderen Innenteil) reiben, um das Maximum der Enterotoxine abzulösen und zu erhalten;
- um die Quantität der ausgebeuteten Toxine zu erhöhen, werden zur Ausbeute der Extrakte wiederholt kleine Mengen PBS oder destilliertes Wasser in die Membran gegeben (z: B.: 1 ml oder 2 ml hinzufügen); die Membran wie oben beschrieben gerieben, und der ausgebeutete Extrakt in die Ampulle gegeben. Diese Schritte werden wiederholt, bis eine Endmasse von 5,0 g bis 5,5 g erreicht ist.

Bei SFPO darf die Masse der analysieren Probe unter 25 g (8.3.1) liegen. Die Endmasse des konzentrierten Extrakts (8.5.2) wird angepasst, um ein Endverhältnis gleich 5 zwischen der Masse des konzentrierten Extrakts und der Masse der Einwaage zu erreichen.

8.6 Lagerung

Wenn der konzentrierte Extrakt (8.5.2) innerhalb von 48 h untersucht wird, wird er bei $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ (6.11) gelagert. Wenn der Nachweis nicht innerhalb von 48 h durchgeführt werden kann, werden die Extrakte bei $\leq -18\text{ °C}$ (6.11) gelagert, es sei denn, vom Hersteller des verwendeten Nachweiskits wurde etwas anderes angegeben.

Bei gefrorenen Extrakten werden diese vollständig aufgetaut und mithilfe eines Vortexers homogenisiert, bevor der Nachweisschritt durchgeführt wird.

8.7 Nachweis

Die Labore müssen sorgfältig die Anweisungen des Herstellers für die von ihnen genutzten Kits befolgen.

Die Leistungskriterien einschließlich relativer Spezifität (rSP, 3.2), relativer Sensibilität (rSE, 3.3), Nachweisgrenze 50 % (LOD₅₀, 3.4) wurden für diesen Prüfvorgang definiert. Diese Berechnung des LOD₅₀ wurde mit dem Programm vorgenommen, das auf folgender Seite verfügbar ist: <http://www.wiwiss.fuberlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich>.

Die Leistungskriterien, die die handelsüblichen Kits erreichen müssen, wurden wie folgt definiert:

rSP und rSE sollten höher als 90 % sein.

BMD für SEA wurde auf 5 ng geschätzt. Dieser Wert wurde von der Überlegung abgeleitet, dass, wenn 100 ng aufgenommen wurden, 0,05 ng SEA/g nachgewiesen werden müssen. Dieser Wert wurde für LOD₅₀ ausgewählt. Da die Gesamtdaten nur für SEA, das am häufigsten vorkommende SE in Ausbrüchen von Staphylokokken bedingten Lebensmittelvergiftungen, verfügbar waren, entschied die Arbeitsgruppe, diesen Wert für die anderen Toxinarten SEB bis SEE zu nutzen.

In dieser Norm sind Werte von verschiedenen Nachweiskits und Lebensmittelmatrizen mit und ohne Dialyse dargestellt. Die Labore müssen sich auf die erhaltenen Daten beziehen, um das Nachweiskit auszuwählen, das die oben erwähnten Kriterien erfüllt.

9 Qualitätskontrolle

Die Labore müssen überprüfen, dass alle relevanten Daten bezüglich Sensibilität, Spezifität sowie LOD₅₀ in den Unterlagen, die vom Hersteller des ausgewählten Kits zur Verfügung gestellt wurden, verfügbar sind.

Außerdem wird empfohlen, von Zeit zu Zeit Chargen des Nachweiskits durch Tests mit Referenzmaterial, wenn verfügbar, zu überprüfen. Ein Beispiel für ein geeignetes Referenzmaterial ist das CRM, das SEA, JRC-IRMM, Geel, Belgien^[6], enthält, wie in ISO 16140-3 beschrieben.

10 Angabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse des Screening-Verfahrens werden wie folgt angegeben:

Staphylokokken-Enterotoxine (SEA – SEE) nachgewiesen in x g der Einwaage;

oder

Staphylokokken-Enterotoxine (SEA – SEE) nicht nachgewiesen in x g der Einwaage.

11 Bestätigung

Bei einem positiven Ergebnis mit oder ohne Dialysekonzentration **darf** die entsprechende Probe **zu einem Referenzlabor zur Bestätigung geschickt werden**, da es bekannt ist, dass Störungen beim Nachweis auftreten können (Anhang C).

12 Leistungsmerkmale des Verfahrens

Die Leistungseigenschaften des Verfahrens wurden in Ringversuchen bestimmt, um die Spezifität, Sensibilität und die LOD₅₀ dieses Verfahrens zu bewerten. Die Daten sind in Anhang A und B für die Ringversuche zusammengefasst, die 2013 bzw. 2014 organisiert wurden.

Die Werte, die aus den Ringversuchen stammen, können nicht auf andere Lebensmittelsorten, als die in Anhang A und B angegebenen, angewendet werden.

Erhaltene Daten für die relative Spezifität, relative Sensibilität und LOD₅₀ sind in Tabelle 1, 2 und 3 dargestellt.

Tabelle 1 — Relative Spezifität-(%) Werte, erhalten durch die drei an fünf Lebensmittelkategorien getesteten Kits

Matrizen	Nachweiskits	Mit DC ¹	Ohne DC ²
Verzehrfertige Lebensmittel (RTE, en: Ready To Eat food) (SEA)	Vidas SET2 ³	100	100
	Ridascreen SET Total ⁴	100	100
	Tecra VIA ⁵	90	100
Fischprodukt (SEC)	Vidas SET2	100	100
	Ridascreen SET Total	100	100
	Tecra VIA	100	80
Dessert (SEE)	Vidas SET2	100	100
	Ridascreen SET Total	100	100
	Tecra VIA	100	100
Käse (SED)	Vidas SET2	98	Nicht durchgeführt
	Ridascreen SET Total	100	
	Tecra VIA	100	
Fleischprodukt (SEA)	Vidas SET2	100	100
	Ridascreen SET Total	100	100
	Tecra VIA	93	100
¹ Mit Dialysekonzentration. ² Ohne Dialysekonzentration. Die folgende Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und stellt keine Anerkennung dieses Produkts durch ISO dar. ³ Vidas SET2 ist ein handelsübliches Produkt und wird von bioMérieux SA, Marcy l'étoile, Frankreich, geliefert. ⁴ Ridascreen SET Total ist ein handelsübliches Produkt und wird von R-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland, geliefert. ⁵ Tecra VIA war ein handelsübliches Produkt und wurde von 3M, Saint Paul, MN, USA, geliefert. Es wurde vom Markt genommen.			

Tabelle 2 — Relative Sensibilität-(%) Werte, erhalten durch die drei an fünf Lebensmittelkategorien getesteten Kits

Kit	Stufe	RTE (SEA)		Fisch (SEC)		Dessert (SEE)		Käse (SED)		Fleisch (SEA)	
		+DC	-DC	+DC	-DC	+DC	-DC	+DC	-DC	+DC	-DC
Vidas SET2	L1	100	87	100	3	100	1	100	*	100	99
	L2	100	100	100	68	100	86	100	*	100	100
	L3	100	100	*	*	100	100	*	*	*	*
Ridascreen SET total	L1	98	10	98	10	94	0	87	*	100	37
	L2	100	52	100	44	100	26	98	*	100	100
	L3	100	100	*	*	100	67	*	*	*	*
Tecra Staph VIA	L1	33	10	97	23	20	0	83	*	95	10
	L2	57	17	100	30	37	10	97	*	100	100
	L3	100	30	*	*	50	10	*	*	*	*
* Nicht berechnet. +DC: mit Dialysekonzentration. -DC: ohne Dialysekonzentration.											

Tabelle 3 — LOD₅₀-(ng/g) Werte, erhalten durch die drei an fünf Lebensmittelkategorien getesteten Kits mit und ohne DC

LOD ₅₀ ng/g	RTE-Lebensmittel (SEA)		Fisch (SEC)		Gebäck (SEE)		Käse (SED)	Fleisch (SEA)	
	+DC	-DC	+DC	-DC	+DC	-DC	+DC	+DC	-DC
Vidas SET 2	0,007	0,019	0,017	0,552	0,017	0,375	*	0,007	0,015
Ridascreen SET Total	0,010	0,184	0,027	0,815	0,036	1,444	0,076	0,010	0,120
Tecra VIA	0,082	0,406	0,031	0,35	0,408	2,673	0,092	0,082	0,211
* Nicht berechnet. +DC: mit Dialysekonzentration. -DC: ohne Dialysekonzentration.									

13 Untersuchungsbericht

Die folgende Formulierung kann als Muster verwendet werden, Extra-Einträge können abhängig vom Einzelfall hinzugefügt werden.

Der Untersuchungsbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) alle für eine vollständige Identifizierung der Probe notwendigen Angaben;
- b) das angewandte Probenahmeverfahren, falls bekannt;
- c) das angewendete Untersuchungsverfahren mit Verweisung auf diese Internationale Norm (ISO 19020-20XX);
- d) alle Arbeitsgänge, die nicht in dieser Internationalen Norm festgelegt sind oder als optional betrachtet werden, zusammen mit den Einzelheiten aller Umstände, die sich auf das (die) Ergebnis(se) ausgewirkt haben können;
- e) das (die) erhaltene(n) Prüfergebnis(se).

Anhang A (informativ)

Ergebnisse der Ringversuche - 2013

Es wurde ein Ringversuch mit 21 Mitarbeitern in 17 Ländern durchgeführt. Die folgenden Lebensmittelsorten waren in die Studie miteinbezogen: Käse entsprechend der Milch- und Milchproduktkategorie und Geflügel entsprechend der Fleischkategorie. Die Lebensmittelproben wurden einzeln auf zwei verschiedenen Kontaminationsstufen geprüft, zuzüglich einer Negativ-Kontrolle. Die Studie wurde 2013 vom Referenzlabor für CPS der Europäischen Union organisiert.

Einer von Februar bis Mai 2013 organisierten Vorstudie zufolge wurden aus sieben geprüften Nachweiskits³⁾ drei (Ridascreen SET Total; Vidas SET2; Tecra Staph Enterotoxin VIA) aufgrund ihrer Leistung bei den fünf Lebensmittelmatrizen ausgewählt. Diese drei ausgewählten Kits wurden durch den Ringversuchs 2013 mit den zwei oben erwähnten Lebensmittelmatrizen evaluiert.

Die folgenden Chargennummern wurden von den teilnehmenden Laboren verwendet:

- Ridascreen SET Total: 12362;
- Vidas SET2: 140412-0 und 140614-0;
- Tecra Staph VIA: 12212012 und 16212084.

Die Werte der Leistungsmerkmale, die aus dem Ringversuch stammen, sind je Probenotyp in den Tabellen A.1 bis A.9 dargestellt. Die von einigen Teilnehmern erhaltenen Daten sind aus den Berechnungen ausschließlich aufgrund klar identifizierter technischer Gründe (Abweichungen vom Protokoll) ausgeschlossen worden.

Die Ergebnisse, die bei Milch und Milchprodukten erhalten wurden (Tabelle A.1 bis A.3), beziehen sich nur auf Untersuchungen mit Dialysekonzentration, da diese in der EU-Verordnung EG 2073/2005 für diese Art Lebensmittelmatrizen obligatorisch ist.

3) Die folgende Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und stellt keine Anerkennung dieses Produkts durch ISO dar. Ridascreen SET Total ist ein handelsübliches Produkt und wird von R-biopharm AG, Darmstadt, Deutschland, geliefert. Vidas SET2 ist ein handelsübliches Produkt und wird von bioMérieux SA, Marcy l'étoile, Frankreich, geliefert. Tecra VIA war ein handelsübliches Produkt und wurde von 3M, Saint Paul, MN, USA, geliefert. Es wurde vom Markt genommen.