

DIN EN ISO 21572



ICS 67.050

Entwurf

Einsprüche bis 2019-03-25
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 21572:2013-06

**Lebensmittel –
Untersuchung auf molekulare Biomarker –
Proteinverfahren (ISO/DIS 21572:2019);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 21572:2019**

Foodstuffs –
Molecular biomarker analysis –
Protein-based methods (ISO/DIS 21572:2019);
German and English version prEN ISO 21572:2019

Produits alimentaires –
Analyse des biomarqueurs moléculaires –
Méthodes basées sur les protéines (ISO/DIS 21572:2019);
Version allemande et anglaise prEN ISO 21572:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-01-25 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, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 64 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 21572:2019) 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 057-01-04 AA „Gentechnisch modifizierte Lebensmittel“ 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 internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 24276	siehe	DIN EN ISO 24276
ISO/IEC 17025	siehe	DIN EN ISO/IEC 17025

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 21572:2013-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Titel wurde geändert, um zu betonen, dass sich das Dokument auf immunochemische Verfahren zum Proteinnachweis bezieht;
- b) eine Einleitung wurde eingefügt;
- c) der Text wurde geändert, damit das Dokument besser auf allgemeine Proteinnachweise anwendbar ist;
- d) Definitionen und Verweisungen wurden aktualisiert;
- e) das Dokument wurde redaktionell den aktuellen Schreibweisen entsprechend bearbeitet;
- f) zusätzliche kleinere Änderungen bzgl. Klärung von Formulierungen und Grammatik wurden eingearbeitet.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 24276, *Lebensmittel — Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten — Allgemeine Anforderungen und Definitionen (ISO 24276)*

DIN EN ISO/IEC 17025, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025)*

— Leerseite —

Lebensmittel — Untersuchung auf molekulare Biomarker — Proteinverfahren (ISO/DIS 21572:2019)

*Produits alimentaires — Analyse des biomarqueurs moléculaires — Méthodes basées sur les protéines
(ISO/DIS 21572:2019)*

Foodstuffs — Molecular biomarker analysis — Protein-based methods (ISO/DIS 21572:2019)

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	6
5 Reagenzien	7
6 Laborausrüstung	7
7 Probenahme	7
8 Durchführung	7
8.1 Allgemeines	7
8.2 Herstellung der Probenlösung	7
8.3 Extraktion	8
8.4 Erstellung der Kalibrierkurven, Positivkontrollen und Referenzmaterialien	8
8.5 Durchführung	8
9 Auswertung und Angabe der Ergebnisse	8
9.1 Allgemeines	8
9.2 Quantitative und halbquantitative Untersuchung	9
9.3 Qualitative Untersuchung	9
10 Spezifische Parameter, die die Ergebnisse beeinflussen können	9
10.1 Allgemeines	9
10.2 Besondere Überlegungen	9
10.2.1 Selektivität	9
10.2.2 Extraktionseffizienz	10
10.2.3 Matrixeffekte	10
10.2.4 Anwendbarkeit des Untersuchungsverfahrens	10
10.2.5 Hook-Effekt	10
10.2.6 Parallelität/Linearität	10
10.2.7 Nachweisgrenzen	11
10.2.8 Bestimmungsgrenzen	11
11 Bestätigung des Verfahrens	11
12 Untersuchungsbericht	11
Anhang A (informativ) Nachweis eines Proteins mit ELISA	13
Anhang B (informativ) Nachweis von Protein(en) durch Teststreifen	25
Literaturhinweise	32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 21572:2019) 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.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 21572:2004 und EN ISO 21572:2013.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 21572:2019 wurde von CEN als prEN ISO 21572:2019 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO 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 staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) 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. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten 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 erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 *Food Products*, Unterkomitee SC 16, *Horizontal methods for molecular biomarker analysis* erarbeitet.

Diese dritte Ausgabe ersetzt die zweite Ausgabe (ISO 21572:2013), die durch eine „minor revision“ überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- Der Titel wurde geändert um zu betonen, dass sich das Dokument auf immunochemische Verfahren zum Proteinnachweis bezieht. Eine Einleitung wurde eingefügt. Der Text wurde geändert, damit das Dokument besser auf allgemeine Proteinnachweise anwendbar ist. Begriffe, Definitionen und Verweisungen wurden aktualisiert. Das Dokument wurde redaktionell den aktuellen Schreibweisen entsprechend bearbeitet. Zusätzliche kleinere Änderungen zu Klärung bzgl. Formulierungen und Grammatik wurden eingearbeitet.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Analysenverfahren, die auf hochspezifischen Wechselwirkungen immunochemischer Bindungen basieren, sind zu den wichtigsten Werkzeugen für die Analyse vieler unterschiedlicher chemischer und makromolekulare Analyten, einschließlich Proteine, geworden. Verfahren, die diese Techniken anwenden, werden in den wissenschaftlichen Gemeinschaften und von Behörden weithin akzeptiert. Immunochemische Assay-Verfahren werden am häufigsten zum Nachweis (Vorhandensein oder Fehlen) und/oder zur Quantifizierung von bestimmten Protein-Analyten, wie zum Beispiel allergieauslösende Proteine, Proteine als Krankheitsmarker oder neu exprimierte Proteine in gentechnisch veränderten Feldfrüchten, angewandt.

Vor der Analyse ist es im Allgemeinen notwendig, die Proben derart zu zerkleinern oder aufzubereiten, dass die Extraktion des Analyten aus der Probenmatrix erleichtert wird. Ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von Analyseverfahren ist daher die Auswahl eines geeigneten Extraktionspuffers, der die Leistungsfähigkeit des Analyseverfahrens nicht beeinträchtigt bei dem der Analyt während der Untersuchung angemessen stabil bleibt.

Die Durchführung der immunochemischen Untersuchung umfasst mindestens zwei Schritte: das Binden oder Einfangen des betreffenden Analyten in Proben mit einem spezifisch auf den Analyten ausgerichteten Antikörper sowie der Nachweis des Antikörper-Analyt-Komplexes mittels einer Technik, die die spezifische Interaktion anzeigt.

Sobald ein Analyseverfahren entwickelt und optimiert wurde, sollte es validiert werden, um nachzuweisen, dass seine Leistungsfähigkeit zuverlässig und für den bestimmungsgemäßen Gebrauch geeignet ist, sowie um die Grenzen des Verfahrens zu ermitteln. Dazu zählt die Durchführung diverser Untersuchungen zur Bewertung von Parametern wie Genauigkeit, Präzision, Empfindlichkeit, Selektivität und der Nachweis quantitativer Grenzen. Die Validierung ermöglicht außerdem die Festsetzung von Leistungskriterien für das Verfahren, mit welchen die regelmäßige Leistungsfähigkeit von Analysen verglichen werden kann, um sicherzustellen, dass akzeptable Analyseergebnisse konsistent dargestellt werden.

Diese Internationale Norm enthält eine Reihe allgemeiner Verfahren und analytischer Überlegungen für die Anwendung immunochemischer Techniken zur Untersuchung auf Zielproteine. Sie behandelt Aspekte der Probenverarbeitung, der Extraktion, des Assay-Aufbaus, der Auslegung und der Darstellung von Ergebnissen sowie relevante Assay-Leistungsparameter. Sie enthält zwei informative Anhänge mit anzuwendenden Beispielfahrern, die auf enzymgebundenen Immunosorbent-Tests (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) und immunochromatographischen Verfahren (Lateral Flow Devices, LFD) beruhen, wenn ein betreffendes Protein (en: protein of interest, POI) in verschiedenen Matrices untersucht wird.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt allgemeine Leitlinien und Leistungskriterien für immunochemische Verfahren zum Nachweis und/oder zur quantitativen Bestimmung eines spezifischen Proteins oder interessierenden Proteinen [(POI)s] in einer spezifischen Matrix fest. Die hier besprochenen Verfahren sind für die Untersuchung vielfältiger verschiedener Proteinarten anwendbar. Einige dieser Verfahren dienen zur Untersuchung von Proteinen, die für die Biotechnik oder zur Krankheitsbestimmung relevant sind, sind aber nicht darauf beschränkt.

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 24276, *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products - General requirements and definitions*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 16577 [1] und der folgende Begriff.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Konjugat

Material, das durch Verbindung von zwei oder mehr Substanzen mit einer kovalenten Bindung über chemische Gruppen hergestellt ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Konjugate von Antikörpern mit Fluorochromen (z. B. chemische Einheit wie ein Molekül oder Gruppe, die als Antwort auf Absorption von einfallendem Licht selber Licht emittiert), radioaktiv markierten Substanzen, Gold oder Enzymen werden oft in Immunoassays verwendet.

4 Kurzbeschreibung

Das Zielprotein wird nach dem für die bestimmte Matrix beschriebenen Verfahren extrahiert und ein bestimmter Antikörper wird zum Nachweis oder zur Konzentrationsbestimmung des POI in der Probe eingesetzt. Das Grundprinzip beim Nachweis eines spezifischen Proteins in Zutaten mit einem Proteinverfahren ist es:

- eine repräsentative Probe der Matrix zu nehmen;
- die Proteine zu extrahieren;
- das spezifische Protein aus der Untersuchungsmatrix nachzuweisen und/oder zu quantifizieren.

5 Reagenzien

Falls nicht anders vom Hersteller der Reagenzien oder Testkits angegeben, werden für die Analyse nur Chemikalien von anerkannter Reinheit und nur deionisiertes, destilliertes, gereinigtes oder gleichwertiges Wasser verwendet.

Andere Chemikalien wie Antikörper, konjugierte Antikörper, Substrate, Stopplösungen und Pufferbestandteile sind verfahrensspezifisch. Besonderheiten in Bezug auf Chemikalien wie Proteinstandards oder Referenzmaterialien, Antikörper, vorbeschichtete Oberflächen, Kontrollen oder Proben sind im betreffenden Verfahren beschrieben.

Reagenzien sind in A.4.2, A.4.3, B.4.2 und B.4.3 festgelegt.

6 Laborausrüstung

Laborausrüstung ist in A.5 und B.5 festgelegt.

7 Probenahme

Die Probenahme ist nicht Bestandteil des in dieser Internationalen Norm beschriebenen Verfahrens, obwohl Anhang A und Anhang B je nach Verfahren Angaben zur Probenahme enthalten. Es wird empfohlen, dass die betroffenen Parteien zu diesem Gegenstand eine Vereinbarung treffen.

8 Durchführung

8.1 Allgemeines

Die Aufbewahrungsbedingungen und Haltbarkeitsdauer von Teststreifen, Antikörpern, konjugierten Antikörpern, Substraten usw. müssen vom Lieferanten deutlich angegeben sein.

Während des gesamten Ablaufs ist zur Vermeidung von Proteinadsorption nur geeignete Laborausrüstung mit niedriger Proteinbindungskapazität (z. B. Polypropylen-Röhrchen) zu verwenden.

Bei der Anwendung dieser Norm müssen die allgemeinen Qualitätssicherungsaufgaben für Laboratorien (z. B. hinsichtlich der Kalibrierung der Geräte, der Doppelbestimmung, der Blindproben, der Verwendung von Referenzmaterialien, der Erstellung von Kalibrierkurven, etc.) befolgt werden. Alle Geräte, die in direkten Kontakt mit der Probe kommen, werden zur Vermeidung von Kontaminationen gründlich gereinigt. Weitere Informationen sind in ISO/IEC 17025 [2] angegeben.

8.2 Herstellung der Probenlösung

Nachdem eine repräsentative Probe erhalten wurde, können spezifische Probenvorbereitungsverfahren aus den Anhängen angewendet werden.

Falls erforderlich, werden die Proben vor der Entnahme der Untersuchungsproben zerkleinert. Pulver/Mehl könnte Quellungseigenschaften haben und erfordert manchmal eine Extraktion mit einem größeren Volumen an Extraktionslösung, falls ein Verfahren des Herstellers diese Angabe nicht festlegt. Wenn die Probe nicht unmittelbar weiterverwendet wird, wird die Laborvorschrift für die Lagerung (z. B. bei –20 °C oder darunter) befolgt.

Laborproben mit einem hohen Fettgehalt können inhomogen sein, und deshalb sollten größere Untersuchungsproben extrahiert werden. Falls zutreffend, sind Anleitungen in den Anhängen zu finden.

Eine entsprechende Menge (wie im Anhang angegeben) einer repräsentativen Untersuchungsprobe wird eingewogen, so dass eine Einwaage für die Extraktion vorliegt. Das Extraktionslösemittel wird hinzugefügt und der Inhalt homogenisiert oder gemischt.

8.3 Extraktion

Das Extraktionsverfahren muss für die Matrix geeignet sein. Einzelheiten zu geeigneten Bedingungen für die Extraktion/Verdünnung der Untersuchungsproben, der Kontrollen und der Referenzmaterialien sind ausführlich im Anhang A für ELISA und im Anhang B für Teststreifen beschrieben. Es sollte darauf geachtet werden, Extraktionsverfahren zu verwenden, die für die jeweilige Matrix validiert worden sind. Extrahierte Proben sollten sogleich verwendet werden oder wie in der Lagerungsvorschrift beschrieben behandelt werden.

8.4 Erstellung der Kalibrierkurven, Positivkontrollen und Referenzmaterialien

Hinsichtlich der Erstellung der Kalibrierkurven, Positivkontrollen und Referenzmaterialien in Anhang A wird empfohlen, für an die Matrix angepasste Referenzmaterialien zu verwenden oder solche, die für die Matrix validiert worden sind. Für die qualitative Anwendung, beispielsweise von Teststreifen, sind Kalibrierkurven routinemäßig nicht erforderlich; es liegt jedoch in der Verantwortung des Analytikers, positive und negative Kontrollen anzuwenden.

8.5 Durchführung

Zur quantitativen Untersuchung wird die erforderliche Anzahl an Vertiefungen (z. B. bei ELISA) für die Einwaage(n) einschließlich Blindwerten und positiven sowie negativen Standards ausgewählt und diese mindestens zweimal in geeigneter Verdünnung (geeigneter Bereich) verwendet.

Zur qualitativen oder semiquantitativen Untersuchung wird die erforderliche Anzahl an Testeinheiten (z. B. Teststreifen oder ELISA-Vertiefungen) ausgewählt, um die Einwaagen zu untersuchen. Die Stabilität des Endsignals darf variieren. Die Ergebnisse sind innerhalb der in den Anhängen angegebenen Zeitrahmen abzulesen.

Entsprechend dem gewählten Verfahren wird die jeweilige Verfahrensvorschrift bezüglich Probenuntersuchung einschließlich der Blindproben und Messstandards (falls erforderlich) befolgt. Die Reaktion läuft bei einem festgelegten Temperaturbereich und einer bestimmten Zeitdauer. Falls erforderlich, wird die Reaktion nach dem im Anhang beschriebenen Verfahren abgestoppt. Wenn beispielsweise das ELISA-Verfahren für die Bestimmung der Ergebnisse ein Spektralphotometer benötigt, wird dieser Schritt durchgeführt. Bei der qualitativen Untersuchung wird das Untersuchungsergebnis üblicherweise visuell ausgewertet, auch hier ist den Anweisungen des Kits zu folgen.

9 Auswertung und Angabe der Ergebnisse

9.1 Allgemeines

Die auszuwertenden Parameter hängen davon ab, ob der Test qualitativ, halbquantitativ oder quantitativ ist.

Der Variationskoeffizient (CV) der Extinktionswerte, die bei Wiederholungsmessungen einer Probenmesslösung erhalten wurden, sollte bei quantitativen Verfahren nicht mehr als 15 % betragen. Der Variationskoeffizient der errechneten Konzentrationen, die bei Wiederholungsmessungen einer Probenmesslösung erhalten wurde, sollte nicht mehr als 20 % betragen.

Wenn die Grenze des Variationskoeffizienten überschritten wird, sollten die Analysen an frisch hergestellter Probenmesslösung wiederholt werden. Um in diesem Falle den Variationskoeffizienten zu bestimmen, müssen mindestens drei Bestimmungen durchgeführt werden (d. h. Werte von drei Reaktionsräumen von Mikrotiterplatten).

Negative Ergebnisse müssen als „negativ an der Nachweisgrenze“ angegeben werden und die Nachweisgrenze selbst muss ebenfalls angegeben werden.

Positive Ergebnisse unterhalb der Bestimmungsgrenze müssen als „positiv über der Nachweisgrenze, aber unter der Bestimmungsgrenze“ angegeben werden. Die Bestimmungs- und Nachweisgrenze muss angegeben werden.

9.2 Quantitative und halbquantitative Untersuchung

Die folgenden Parameter sind für die Auswertung heranzuziehen: Rohdaten der Probenmesslösung, der Blindproben, des Referenzmaterials oder Messstandards und der Negativkontrolle, der prozentuale Anteil des Variationskoeffizienten (prozentualer CV) zwischen den Wiederholungen, prozentualer CV des Analysestandards und prozentualer CV der Kontrollproben.

Gegebenenfalls sollte die Messunsicherheit gemäß ISO/IEC 17025 [2], angegeben werden.

Quantitative Ergebnisse dürfen nicht auf der Grundlage einer Extrapolation angegeben werden, bei der der höchste Kalibrierwert überschritten oder der niedrigste unterschritten wird.

9.3 Qualitative Untersuchung

Für qualitative Untersuchungen, einschließlich aller ihrer Anwendungen, werden die entsprechenden Parameter in den Anhängen beschrieben. Die Nachweisgrenze muss immer angegeben werden und negative Ergebnisse müssen als „negativ an der Nachweisgrenze“ angegeben werden.

Positive Ergebnisse müssen zusammen mit der Nachweisgrenze angegeben werden.

10 Spezifische Parameter, die die Ergebnisse beeinflussen können

10.1 Allgemeines

Die im Verfahren von Anhang A aufgeführten Leistungskriterien sind eine Sammlung von Leistungsanforderungen, die für jedes Verfahren bei der Entwicklung, der Validierung und der routinemäßigen Anwendung festgelegt wurden. Diese Parameter müssen für jedes Verfahren geschätzt und ermittelt werden und zuverlässig und von gleich bleibend hoher Qualität sein. Nach jeder Durchführung eines Verfahrens müssen die ermittelten Parameter bewertet und mit den festgelegten Leistungskriterien des Verfahrens verglichen werden.

Wenn ein Wert (z. B. der Variationskoeffizient bei wiederholten Bestimmungen) nicht mit den Verfahrensanforderungen übereinstimmt, ist das ein Hinweis darauf, dass das Ergebnis atypisch ist und eine gründlichere Auswertung der Daten rechtfertigt. Die Liste der Anforderungen muss als Gesamtheit betrachtet werden, individuelle Parameter brauchen in bestimmten Fällen nicht den Anforderungen zu entsprechen, die Daten können aber dennoch völlig annehmbar sein. Falls eines der Kriterien nicht übereinstimmt, sollte es jedoch schriftlich vermerkt werden und die Daten sollten ausgewertet werden, um zu bestimmen, ob die Auswertung der Ergebnisse verändert werden sollte oder ob eine einzelne Probe oder ein Probensatz erneut untersucht werden sollte. Diese Entscheidungen sollten von einem technischen Sachverständigen getroffen werden, der alle Kriterien in ihrem Zusammenhang auswertet.

10.2 Besondere Überlegungen

10.2.1 Selektivität

Für jeden zu bestimmenden POI oder Analyten (Protein) und jede zu prüfende Matrix muss eine hinreichende Selektivität des Verfahrens für den einzelnen Analyten nachgewiesen werden. Falls zutreffend, sollte die Kreuzreaktivität für Analoge (Proteine mit einer vergleichbaren Sequenz oder Struktur) beurteilt

werden. Um das Vorhandensein eines POI in einer Nicht-POI-Probe zu untersuchen, werden die Probe ohne POI und die das POI enthaltende Probe bei geeigneten Verdünnungsstufen untersucht und verglichen.

Diese Selektivitätsprüfung wird im Allgemeinen während der Entwicklung und Validierung des Verfahrens ausgeführt und ist nicht notwendig während der Routineanalyse von Proben, für die das Verfahren vorher validiert wurde. Die Selektivität der Testkits, entweder auf ELISA oder auf Teststreifen beruhende Verfahren, sollten vom Hersteller der Testkits behandelt werden (z. B. im Beipackzettel des Herstellers aufgeführt).

10.2.2 Extraktionseffizienz

Besonders sorgfältig muss der Einfluss von Prozessparametern bewertet werden, die bei der Herstellung einer gegebenen Laborprobe angewandt werden.

Die Extraktionseffizienz sollte besonders bei quantitativen Verfahren so hoch wie möglich sein, um die größte Empfindlichkeit des Immunoassays zu gewährleisten. Die Leistung des Verfahrens ist matrix-abhängig. Die Extraktionseffizienz sollte für jede Matrix bestimmt und dokumentiert werden.

Es muss nachgewiesen werden, dass es sich um ein reproduzierbares Extraktionsverfahren handelt, und das Kalibrierverfahren (falls angewendet) sollte eine unvollständige Extraktion berücksichtigen.

10.2.3 Matrixeffekte

In den Anwendungsbereichen müssen die Matrices, auf die der gegebene Immunoassay anwendbar ist, deutlich und präzise bestimmt werden. Die Verwendung von an die Matrix angepassten Standards erlaubt einen direkten Vergleich von Standards und Proben. Werden die Proben jedoch gegen Referenzmaterialien bestimmt, die nicht dieselbe Matrix haben, müssen Matrixeffekte ermittelt werden.

Zum Beispiel wird ein Negativ-Extrakt für jede Probe (Matrix) hergestellt, die entsprechend dem Verfahren zu untersuchen ist, sowie ein positiver Kontroll-Extrakt bekannter Konzentration. Es wird eine Reihe von Verdünnungen des positiven Kontroll-Extrakts im Negativ-Extrakt hergestellt und die daraus ermittelte Dosis-Wirkungs-Kurve mit der Kalibrierkurve des Verfahrens verglichen. Wenn beide Kurven unterschiedlich sind, liegt ein Matrixeffekt vor. Eine Matrix ist zu verwenden, die der zu untersuchenden echten Probe am ehesten entspricht. Als Referenz sollte auch eine Verdünnungskurve mit einem positiven Kontroll-Extrakt bekannter Konzentration einbezogen werden. Die Form der Kalibrierkurve sollte sich nicht infolge von Matrixeffekten verändern.

10.2.4 Anwendbarkeit des Untersuchungsverfahrens

Die Verarbeitungsbedingungen von Lebensmitteln führen im Allgemeinen zum Abbau oder zur Denaturierung des POI, was die Immunreaktivität substanziell beeinflusst. Immunoassays sollten auf ihre Anwendbarkeit auf den POI in verarbeiteten Produkten geprüft werden.

10.2.5 Hook-Effekt

In einem auf Antikörper basierenden Teststreifen oder bei Mikrotiterplatten konnte ein Hook-Effekt (Sättigungseffekt) zu falsch negativen Ergebnissen führen. Daher ist es erforderlich, sorgfältig zu zeigen, dass der Arbeitsbereich problemlos die praktischen Erfordernisse der POI-Untersuchungsprobe abdeckt.

10.2.6 Parallelität/Linearität

Für quantitative Untersuchungen sollte der erwartete dynamische Bereich des Immunoassays im Anwendungsbereich für alle in ihm erfassten Matrices ausdrücklich festgelegt werden. Das Verhältnis des Geräte-response zur bekannten Konzentration des POI ist nicht unbedingt linear, muss aber für jedes quantitative Immunoassay-Verfahren durch den Hersteller identifiziert worden sein. Es kann in einem sehr engen Bereich des POI linear sein, aber in den meisten Fällen zeigen die Immunoassays eine komplexere Beziehung, was bereits als Quadrat oder 4-Parameter-Funktion beschrieben worden ist.

Es sollten mindestens vier Kalibrierpunkte erstellt werden und diese sollten den verwendbaren Teil der Kurve widerspiegeln.

10.2.7 Nachweisgrenzen

Unterhalb der Nachweisgrenze sollten die Ergebnisse nicht ausgewertet werden. In diesem Fall müssen die Ergebnisse nach einem in den Unterabschnitten 9.1 bis 9.3 dieser Norm beschriebenen geeigneten Verfahren angegeben werden.

10.2.8 Bestimmungsgrenzen

Die Bestimmungsgrenzen müssen für jeden Satz an Kalibranten (oder Verdünnungen) ausdrücklich festgelegt werden.

Die geschätzte Konzentration einer unbekannten Probenmesslösung muss interpoliert und nicht extrapoliert werden.

Unterhalb der Bestimmungsgrenze, oberhalb des höchsten oder unterhalb des niedrigsten Kalibrierpunktes dürfen die Ergebnisse nicht extrapoliert werden.

11 Bestätigung des Verfahrens

Um die Zuverlässigkeit der Verfahren festzustellen, können andere Verfahren wie der Western-Blot, Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC), Massenspektrometrie (MS) oder ein funktionelles Testsystem zur Messung geteilter analytischer Proben bekannter Konzentration Anwendung finden. Die Ergebnisse der beiden Verfahren werden dann qualitativ/quantitativ verglichen. Das ist besonders wichtig für Immunoassays, da es zu Kreuzreaktionen zwischen Antikörpern und anderen in einer Matrix enthaltenen Analyten kommen konnte.

12 Untersuchungsbericht

Der Untersuchungsbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) alle zur Identifizierung des Labors notwendigen Angaben;
- b) alle zur Identifizierung der Laborprobe notwendigen Angaben;
- c) eine Verweisung auf diese Norm und das angewendete Verfahren sowie eine Angabe, ob es sich um ein qualitatives, quantitatives oder halbquantitatives Verfahren handelt;
- d) die Nachweisgrenze;
- e) die untere und/oder obere Bestimmungsgrenze;
- f) das Datum und die Art des angewandten Probenahmeverfahrens (falls bekannt);
- g) das Datum der Probenannahme;
- h) das Datum des Untersuchungsbeginns oder andere geeignete Dokumentation;
- i) die Menge der Einwaage;
- j) die Menge der Untersuchungsprobe;
- k) die Ergebnisse und die Einheiten, in denen sie angegeben werden;

- l) besondere Einzelheiten, die bei der Untersuchung wahrgenommen wurden;
- m) falls bekannt, sollten Einschränkungen, wie z. B. mögliche Kreuzreaktanten oder die Selektivität jedes Verfahrens angegeben sein;
- n) jeder im Verfahren nicht festgelegte oder als freigestellt zu betrachtende Arbeitsschritt, der jedoch das Ergebnis beeinflusst haben könnte.

Anhang A (informativ)

Nachweis eines Proteins mit ELISA

A.1 ELISA-Verfahren

ELISA-Verfahren wurden erfolgreich und in der Routine zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen eingesetzt.

Die meisten kommerziellen ELISA-Verfahren sind für Proben geeignet, die wenig oder gar nicht verarbeitet wurden und bei denen daher die POIs nicht denaturiert sind. Beispielsweise werden Lebensmittelzutaten während des Herstellens unter anderem erhitzt, mit Dampf behandelt oder getrocknet, was zur Denaturierung der Proteine führt. Dadurch wird die Fähigkeit von immunologischen Reagenzien, wie sie bei ELISA-Verfahren angewendet werden, sich an die spezifischen Proteine in ihrem nicht-nativen Zustand zu binden, beeinflusst oder stark vermindert. Die Selektivität des Verfahrens sollte angegeben werden, da in bestimmten Fällen ELISAs auch mit ähnlichen Proteinen reagieren.

ELISA-Verfahren werden in der Routine qualitativ zum Nachweis der An- oder Abwesenheit oder auch quantitativ eingesetzt. Die Nachweisgrenze (LOD) für ein ELISA-Kit ist üblicherweise so vom Kithersteller eingestellt, um auch die Varietät noch abzudecken, die das Protein am wenigsten enthält. Die Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen wird untersucht. ELISA-Kits sind weltweit kommerziell erhältlich. Anwendungen für andere proteinhaltige Matrices, die keine Getreide sind, wie z. B. Blätter, sind durch den Kithersteller deutlich in den Kit-Beipackzetteln angegeben, und sollten in den Validierungsangaben der Hersteller berücksichtigt sein.

A.2 Anwendungsbereich

Dieser Anhang stellt ein allgemein gehaltenes Beispiel für die Anwendung eines ELISA-Verfahrens dar, wenn ein POI vorliegt und dieses quantifiziert werden soll. Das Verfahren ist auf Proben anwendbar, die kaum oder nicht verarbeitet wurden und bei denen folglich die POIs nicht denaturiert sind. Beispielsweise werden Lebensmittelbestandteile während des Herstellens erhitzt, was die Fähigkeit zum Nachweis der Proteine beeinflussen kann. Jeder Hersteller muss in dem Kit die Vorgehensweise beschreiben und darlegen, welche Matrix untersucht werden kann, wobei auch die während der Entwicklung und Validierung des Verfahrens erstellten Annahme- und Zurückweisungskriterien anzugeben sind.

A.3 Kurzbeschreibung

Für die Bestimmung des POI wird ein direkter enzymgebundener Immunosorbent-Sandwich-Test (ELISA) angewendet, wie in Bild A.1 bis Bild A.4 dargestellt:



Bild A.1 — Schritt 1 — Die Oberfläche einer Mikrotiterplatte ist mit einem spezifischen monoklonalen Fänger-Antikörper beschichtet.

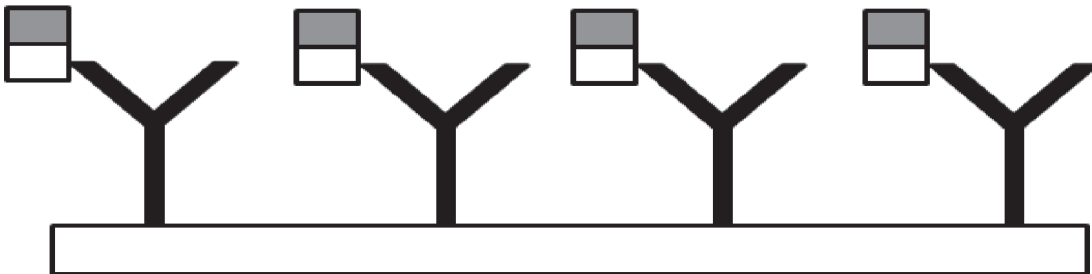


Bild A.2 — Schritt 2 — Wenn die interessierende Probe hinzugefügt wird, bindet der Fänger-Antikörper das Antigen. Ungebundene Bestandteile der Probe werden durch Waschen entfernt.

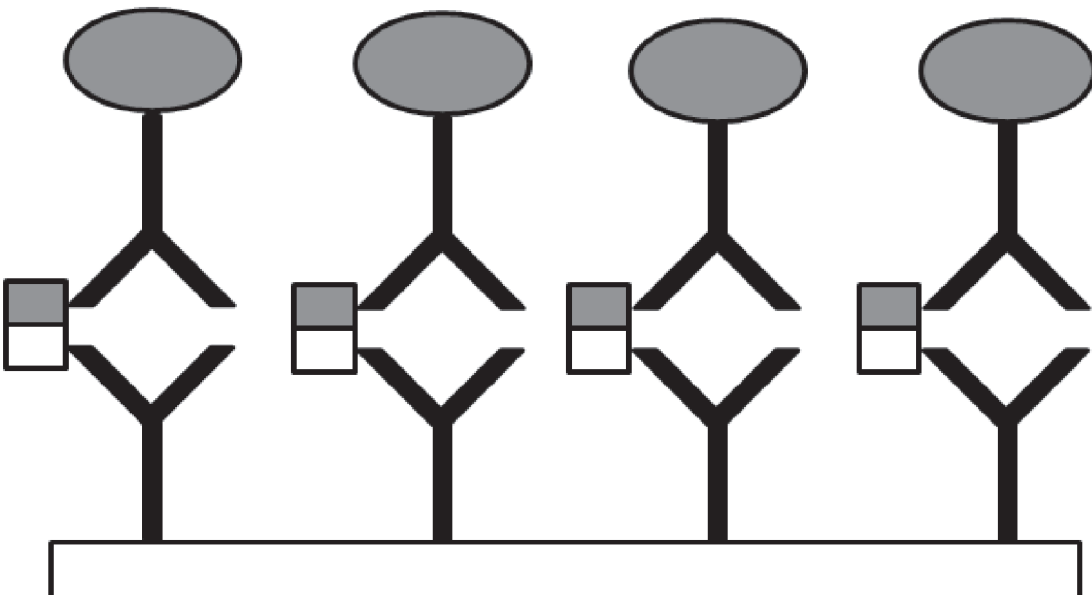


Bild A.3 — Schritt 3 — Nach dem Waschen wird ein polyklonaler, kovalent mit (beispielsweise) Meerrettich-Peroxidase (en: horseradish peroxidase (HRP)) gekoppelter Antikörper hinzugefügt, der spezifisch für eine zweite antigene Determinante des gebundenen POI ist.

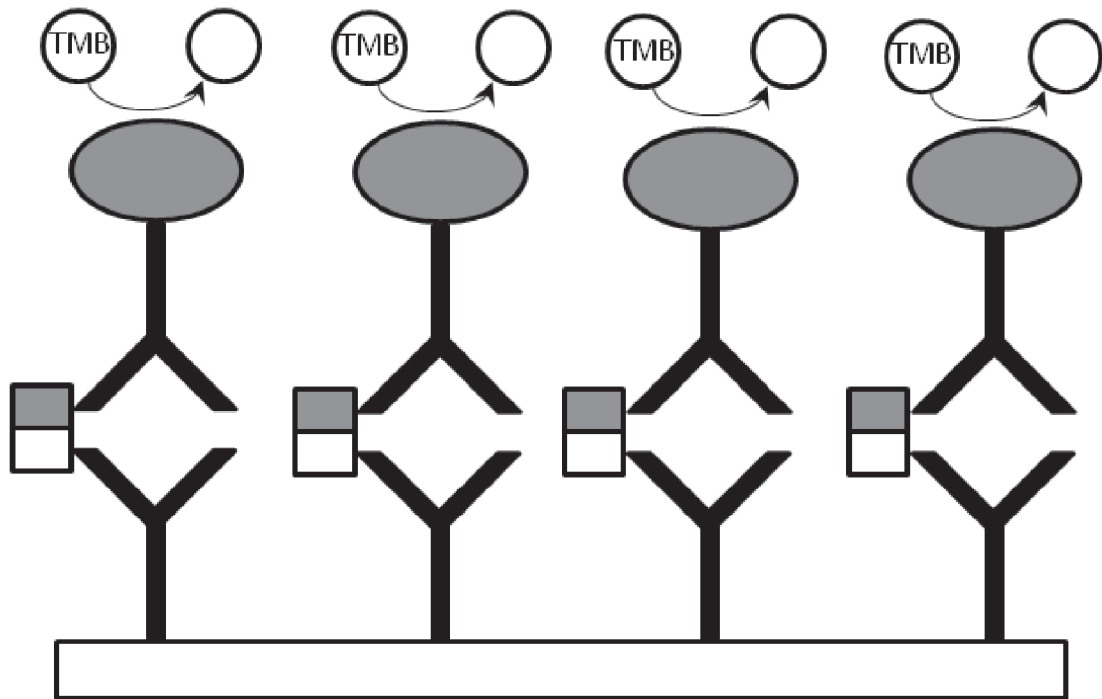


Bild A.4 — Schritt 4 — Nach dem Waschen wird Tetramethylbenzidin (TMB), ein chromogenes Substrat der Meerrettich-Peroxidase, hinzugefügt. Die Meerrettich-Peroxidase erzeugt ein Farbsignal, das im linearen Bereich proportional der Antigenkonzentration ist. Um die Farbentwicklung zu beenden, wird eine Stopplösung hinzugefügt. Der Grad der erzeugten Färbung wird bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

A.4 Reagenzien

A.4.1 Allgemeines

Falls nicht anders angegeben, werden für die Analyse nur Chemikalien von anerkannter Reinheit und nur deionisiertes oder destilliertes Wasser verwendet.

Jede Abweichung von den festgelegten Leistungskriterien kann auf instabile Reagenzien hinweisen. Beispielsweise sollten trübe Pufferlösungen oder trübe Konjugatlösungen nicht verwendet werden.

Alle Kitbestandteile sollten bei etwa 2 °C bis 8 °C aufbewahrt werden. Verwendungsdauer der Bestandteile im Kit ist durch ein Verfallsdatum angegeben.

Die Antikörperkonjugat-Stammlösung (A.6.4.1) und die Antikörperkonjugat-Arbeitslösung (A.6.4.2) können bei 2 °C bis 8 °C je nach Kit-spezifischer Vorschrift zur Verdünnung und Lagerung aufbewahrt werden.^{N1)} Der verdünnte Waschpuffer sollte ebenso entsprechend der Kit-spezifischen Vorschrift oder der im Laboratorium gängigen Praxis aufbewahrt werden.

^{N1)} Nationale Fußnote: Dieser Satz hätte in der englischen Originalfassung gestrichen werden sollen, da stattdessen der vorige Satz eingefügt wurde. Es wurde jedoch übersehen, diesen zweiten Satz zu streichen.

A.4.2 Gewöhnlich mit dem Testkit gelieferte Materialien und Reagenzien

A.4.2.1 Extraktionspuffer.

A.4.2.2 Testpuffer.

A.4.2.3 Streifen oder Platten mit beschichteten Reaktionsräumen.

A.4.2.4 Konjugierter Nachweis-Antikörper.

A.4.2.5 Konjugatverdünnungspuffer.

A.4.2.6 Chromogenes Substrat.

A.4.2.7 Stopplösung.

A.4.2.8 Konzentrierter Waschpuffer.

A.4.2.9 An die Matrix angepasste negative und positive Referenzmaterialien.

A.4.3 Nicht mit dem Testkit gelieferte Chemikalien

A.4.3.1 Alkohol.

A.4.3.2 Detergens, für das Ultraschallbad (optional).

A.5 Laborausrüstung

A.5.1 Allgemeines

Übliche Laborausrüstung und insbesondere Folgendes:

A.5.1.1 Kühlschrank, auf etwa 4 °C eingestellt.

A.5.1.2 Konische Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen, verschließbar, z. B. 15 ml.

A.5.1.3 Kunststoff- oder Aluminiumfolie (optional).

A.5.1.4 Klebeband, um ein Verrutschen der Streifen beim Waschen der Platte zu verhindern.

A.5.1.5 Waschflasche, z. B. 500 ml.

A.5.1.6 Präzisionspipetten, die geeignet sind, Volumina von z. B. 20 µl bis 500 µl zu pipettieren.

A.5.1.7 Mischer, kleiner Probenmischer.

A.5.1.8 Waage mit einer Fehlergrenze von 0,01 g.

A.5.1.9 Zentrifuge, die geeignet ist, eine relative Fliehkraftbeschleunigung von mindestens 5 000 *g* zu erzeugen.

A.5.1.10 Lesegerät für Mikrotiterplatten, das für eine Extinktionsmessung bei 450 nm oder bei der im Kit angegebenen Wellenlänge geeignet ist.

A.5.1.11 Wärmeschrank oder Wasserbad, auf 37 °C einstellbar (falls erforderlich).

A.5.1.12 Sieb mit einer Maschenweite von 450 µm oder Gleichwertiges (optional).