

DIN CEN ISO/TS 23758

ICS 67.100.01

**Leitlinie für die Validierung qualitativer Screening-Verfahren zur
Detektion von Tierarzneimittelrückständen in Milch und
Milcherzeugnissen (ISO/TS 23758:2021);
Deutsche Fassung CEN ISO/TS 23758:2021**

Guidelines for the validation of qualitative screening methods for the detection of residues of
veterinary drugs in milk and milk products (ISO/TS 23758:2021);
German version CEN ISO/TS 23758:2021

Lignes directrices pour la validation des méthodes qualitatives de dépistage des résidus de
médicaments vétérinaires dans le lait et les produits laitiers (ISO/TS 23758:2021);
Version allemande CEN ISO/TS 23758:2021

Gesamtumfang 47 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (CEN ISO/TS 23758:2021) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 302 „Milch und Milcherzeugnisse — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-05-13 AA „Milch und Milcherzeugnisse - Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Technische Spezifikationen sind nicht Bestandteil des Deutschen Normenwerks.

Eine Technische Spezifikation ist das Ergebnis einer Normungsarbeit, das wegen bestimmter Vorbehalte zum Inhalt oder wegen des gegenüber einer Norm abweichenden Aufstellungsverfahrens von DIN noch nicht als Norm herausgegeben wird.

Zur vorliegenden Technischen Spezifikation wurde kein Entwurf veröffentlicht.

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

ISO 13969 IDF 183	siehe	DIN EN ISO 13969
ISO 18330 IDF 188	siehe	DIN EN ISO 18330
ISO/IEC 17025	siehe	DIN EN ISO/IEC 17025

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 13969, *Milch und Milchprodukte — Anleitung für eine vereinheitlichte Beschreibung mikrobiologischer Hemmstofftests*

DIN EN ISO 18330, *Milch und Milchprodukte — Anleitung für die vereinheitlichte Beschreibung von Immunoassays oder Rezeptorassays zum Nachweis von Rückständen antimikrobiell wirksamer Stoffe*

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

Deutsche Fassung

Leitlinie für die Validierung qualitativer Screening-Verfahren zur Detektion von Tierarzneimittelrückständen in Milch und Milcherzeugnissen (ISO/TS 23758:2021)

Guidelines for the validation of qualitative screening
methods for the detection of residues of veterinary
drugs in milk and milk products (ISO/TS 23758:2021)

Lignes directrices pour la validation des méthodes
qualitatives de dépistage des résidus de médicaments
vétérinaires dans le lait et les produits laitiers
(ISO/TS 23758:2021)

Diese Technische Spezifikation (CEN/TS) wurde vom CEN am 29. September 2021 als eine künftige Norm zur vorläufigen Anwendung angenommen.

Die Gültigkeitsdauer dieser CEN/TS ist zunächst auf drei Jahre begrenzt. Nach zwei Jahren werden die Mitglieder des CEN gebeten, ihre Stellungnahmen abzugeben, insbesondere über die Frage, ob die CEN/TS in eine Europäische Norm umgewandelt werden kann.

Die CEN Mitglieder sind verpflichtet, das Vorhandensein dieser CEN/TS in der gleichen Weise wie bei einer EN anzukündigen und die CEN/TS verfügbar zu machen. Es ist zulässig, entgegenstehende nationale Normen bis zur Entscheidung über eine mögliche Umwandlung der CEN/TS in eine EN (parallel zur CEN/TS) beizubehalten.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, 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: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Kurzbeschreibung	10
5 Allgemeine Anforderungen an Test/Kit	10
6 Reagenzien	11
6.1 Rückstandsfreies Standard-Ausgangsmaterial	11
6.2 Antibiotika	12
6.3 Standardstammlösung	12
6.4 Arbeitsstammlösungen	13
6.5 Dotierte Probe	13
7 Geräte und Hilfsmittel	13
8 Probenherstellung	13
8.1 Herstellung der Stammlösung	13
8.2 Herstellung der Arbeitsstammlösung	14
8.3 Auswahl der Probe des rückstandsfreien Ausgangsmaterials	14
8.4 Herstellung der dotierten Probe	15
9 Durchführung	15
9.1 Validierung	15
9.1.1 Allgemeines	15
9.1.2 Nachweisempfindlichkeit (CC β)	15
9.1.3 Selektivität/Spezifität des Tests	20
9.1.4 Untersuchung der Robustheit	21
9.1.5 Wiederholpräzision des Lesegerätes und des Tests	26
9.1.6 Teilnahme an einem (inter)nationalen Ringversuch	28
9.2 Verifizierungsuntersuchung eines übertragenen Screening-Verfahrens	28
9.2.1 Allgemeines	28
9.2.2 Nachweisempfindlichkeit	29
9.2.3 Selektivität/Spezifität des Tests	29
9.2.4 Untersuchung der Robustheit	29
9.2.5 Wiederholpräzision des Lesegerätes und des Tests	30
9.2.6 Teilnahme an einem (inter)nationalen Ringversuch	31
Anhang A (informativ) Europäische Gesetzgebung zu Tierarzneimitteln in Kuhmilch	32
Anhang B (informativ) US-Gesetzgebung zu Tierarzneimittelrückständen in Milch	37
Anhang C (informativ) Liste problematischer Verbindungen bei der Herstellung von Stammlösungen	39
Anhang D (informativ) Zusammenfassung der Stabilität von Antibiotika in Lösung und in Matrix	41
Literaturhinweise	44

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (CEN ISO/TS 23758:2021) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 302 „Milch und Milcherzeugnisse — Probenahme- und Untersuchungsverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von NEN gehalten wird.

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.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, 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/TS 23758:2021 wurde von CEN als CEN ISO/TS 23758:2021 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (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 Normungsthemen 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 5, *Milk and milk products*, und von der International Dairy Federation (IDF) in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 302, *Milch und Milcherzeugnisse — Probenahme- und Untersuchungsverfahren*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet. Es wird von ISO und IDF gemeinsam veröffentlicht.

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.

IDF (International Dairy Federation) ist eine private, gemeinnützige Organisation, welche auf globaler Ebene die Interessen verschiedener interessierter Parteien der Milchwirtschaft vertritt. Die Mitglieder der IDF sind in nationalen Komitees organisiert, bei denen es sich um nationale Vereinigungen von Vertretern der in der Milchwirtschaft tätigen nationalen Interessensgruppen, einschließlich Milchbauern, die milchverarbeitende Industrie, Lieferanten von Molkereierzeugnissen, Wissenschaftlern und Regierungsstellen sowie Lebensmittelüberwachungsbehörden, handelt.

ISO und IDF arbeiten in allen Belangen der Normung von Probenahme- und Analyseverfahren für Milch und Milcherzeugnisse eng zusammen. Seit 2001 veröffentlichen ISO und IDF ihre Internationalen Normen gemeinsam. Dabei verwenden sie die Logos beider Organisationen.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. IDF 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.

Dieses Dokument wurde vom IDF *Standing Committee on Analytical Methods for Additives and Contaminants* und vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 5, *Milk and milk products*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 302, *Milch und Milcherzeugnisse — Probenahme- und Untersuchungsverfahren*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet. Es wird von ISO und IDF gemeinsam veröffentlicht.

Dieses IDF-geprüfte Verfahren entspricht einer Öffentlich Verfügbaren Spezifikation der ISO (ISO/PAS) oder einer Technischen Spezifikation der ISO (ISO/TS) und wird daher gemeinsam unter ISO-Bedingungen veröffentlicht.

Die Arbeiten wurden vom ISO/IDF Action Team A10 des *Standing Committee on Analytical Methods for Additives and Contaminants* unter der Federführung seines Projektleiters, Dr. W. Reybroeck (BE), durchgeführt.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument beschreibt allgemeine Arbeitsabläufe und Arbeitsvorschriften für die Validierung und Verifizierung von qualitativen Screening-Tests zum Nachweis von Tierarzneimittelrückständen in Flüssigmilch (roh, pasteurisiert, UHT sowie rekonstituierte Milchpulver und Molkeneiweißextrakte), einschließlich biologischer Verfahren. Diese Leitlinie umfasst nicht die Validierung der Rückstandsanalyse durch HPLC, UHPLC oder LC-MS/MS.

Dieses Dokument soll für Hersteller von Screening-Testkits, Labore, die Screening-Verfahren oder -Tests validieren, zuständige Behörden und Molkereien oder Endanwender von Reagenzien oder Tests zum Nachweis von Tierarzneimittelrückständen in Milcherzeugnissen nützlich sein. Dieses Dokument erleichtert und verbessert die Validierung und Verifizierung von Screening-Verfahren. Die Ziele dieses Dokuments sind eine Harmonisierung der Validierung von Verfahren oder Testkits, damit alle Beteiligten volles Vertrauen in das Ergebnis des Rückstand-Screenings haben, und die Überschneidung und Vervielfachung der Validierungsarbeit in verschiedenen Laboren durch das zur Verfügung stellen der von einem unabhängigen Labor erzielten Validierungsergebnisse zu begrenzen. Darüber hinaus ermöglicht eine harmonisierte Validierungs- und Verifizierungsverfahrensweise einen Vergleich der Leistungsfähigkeit verschiedener Screening-Verfahren.

Dieses Dokument impliziert nicht, dass alle Endanwender verpflichtet sind, alle vorgeschlagenen Verifizierungsarbeiten durchzuführen.

Die Verifizierung der korrekten Anwendung von Reagenzien/Kits zum Nachweis antimikrobiell wirksamer Substanzen ist nicht Teil des Anwendungsbereichs dieses Dokuments.

2 Normative Verweisungen

Es gibt keine normativen Verweisungen in diesem Dokument.

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:

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

3.1 biologisches Verfahren

Verfahren, mit dem Zellreaktionen auf Analyte nachgewiesen werden

BEISPIEL Hemmung des bakteriellen Wachstums, immunologischer Test und Rezeptortest.

3.2

qualitatives Verfahren

Verfahren, das eine Ja/Nein-Antwort liefert, ohne Angabe der Konzentration des mutmaßlichen Analyten

BEISPIEL 1 Mikrobielle Wachstumshemmtests, die als Ergebnis entweder „kein Hemmhof“ oder „Hemmhof“ liefern.

BEISPIEL 2 Hemmtests, die eine Farbänderung des Wachstumsmediums liefern.

BEISPIEL 3 Immunochemische Tests/Ligandenbindungstests, bei denen eine Reaktion als „oberhalb“ oder „unterhalb“ eines Cut-Off-Werts angesehen wird, oder bei denen Analyten mit verschiedenen Kreuzreaktivitäten in den Anwendungsbereich des Verfahrens fallen.

BEISPIEL 4 Biosensoren.

3.3

Matrix

Anteil der Probe, der kein Analyt ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Matrices sind im Anwendungsbereich enthalten.

3.4

Nachweisempfindlichkeit

CC β

geringster Gehalt des Analyten, der in einer Probe mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von β nachgewiesen, identifiziert und/oder quantifiziert werden kann

Anmerkung 1 zum Begriff: Der β -Fehler ist die Wahrscheinlichkeit, dass die untersuchte Probe wirklich nicht konform ist, obwohl ein konformer Messwert erhalten wurde.

3.5

Cut-Off-Wert

Reaktion oder Signal aus einem Screening-Test, die/das anzeigt, dass eine Probe einen Analyten bei oder oberhalb der Screening-Zielkonzentration enthält

3.6

rückstandsfreie Matrixprobe

Negativkontrollprobe

Probe von Tieren mit bekannter Behandlungsgeschichte, die der betreffenden Substanz nicht ausgesetzt waren

Anmerkung 1 zum Begriff: Falls keine Proben von derartigen Tieren verfügbar sind, können auch Proben annehmbar sein, die zuvor durch ausreichend empfindliche physikalisch-chemische Tests als konform und keine Rückstände der interessierenden Substanz enthaltend bestätigt wurden.

Anmerkung 2 zum Begriff: Siehe Tabelle 1.

3.7

Positivkontrollprobe

Kontrollprobe, die mit dem Untersuchungsanalyten auf der Screening-Zielkonzentration dotiert ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Dies kann jedoch auch eine positiv aufgetretene Probe (d. h. eine Probe, die von Tieren entnommen wurde, die mit der betreffenden Substanz behandelt wurden) oder zertifiziertes Referenzmaterial sein.

3.8

Screening-Zielkonzentration

Konzentration, bei der ein Screening-Test die Probe als „screen-positiv“ (möglicherweise nicht konform) einstuft

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese sollte immer geringer als der gesetzliche Grenzwert sein.

3.9

Validierung

Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die Anforderungen für einen spezifischen beabsichtigten Gebrauch oder eine Anwendung, wie z. B. ein Untersuchungs- oder Messverfahren, erfüllt worden sind

BEISPIEL Verfahrensweise, die im Ausgangslabor (Labor des Herstellers) oder in einem unabhängigen Labor angewendet wird.

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Validierung bestimmt häufig die Gebrauchstauglichkeit eines Verfahrens.

3.10

Verifizierung

Verfahrensweise, die auf ein Verfahren angewendet wird, das zuvor bei einer Transfervalidierung validiert wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Verifizierungsverfahrensweise wird von einem Anwenderlabor für dieselbe Matrix, die ursprünglich validiert wurde, angewendet, um zu zeigen, dass das Verfahren in diesem Labor mit lokal bezogener Milch zuverlässig funktioniert und gebrauchstauglich ist.

3.11

Ausgangslabor

Labor, das die vollständige Validierung des Verfahrens durchgeführt hat

Anmerkung 1 zum Begriff: Dies ist vorzugsweise ein nach ISO/IEC 17025 akkreditiertes unabhängiges Labor und vorzugsweise nicht das Labor, das das Verfahren entwickelt hat. Das Labor sollte Erfahrung mit Rückstandsuntersuchungen und der Validierung von Screening-Tests zum Nachweis von Tierarzneimittelrückständen in Milch haben.

3.12

Anwenderlabor

Labor, das die Verifizierung des Verfahrens durchführen wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Dies könnte jedes beliebige Labor sein, das an der Nutzung des Verfahrens interessiert ist.

3.13

Spektrum

Variationsbreite von Substanzen, die durch einen Test detektiert werden können

Anmerkung 1 zum Begriff: Mit einigen Tests werden mehrere Klassen von Antibiotika und eine große Anzahl von Substanzen detektiert, während andere spezifischer sind.

3.14

gesetzlicher Grenzwert

lebensmittelrechtlich festgelegter Wert für Rückstände in Lebensmitteln

Anmerkung 1 zum Begriff: MRL (siehe 3.15), MRPL (siehe 3.16), RPA (siehe 3.17) können gesetzliche Grenzwerte sein.

3.15

Rückstandshöchstmenge für Tierarzneimittel

MRL, en: maximum residue limit for veterinary drugs

Höchstkonzentration eines Rückstands, die aus der Verwendung von Tierarzneimitteln entsteht, die von der Codex-Alimentarius-Kommission als rechtlich zulässig empfohlen oder als in Lebensmitteln vertretbar anerkannt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Antibiotika werden zur Behandlung und Vorbeugung von Krankheiten in der Tierhaltung eingesetzt und daher können in Lebensmitteln geringe Rückstände von Antibiotika vorhanden sein. MRL werden für pharmakologisch wirksame Substanzen festgelegt, die in in Verkehr gebrachten Tierarzneimitteln verwendet werden oder dazu bestimmt sind. In der EU werden die MRL durch die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA, en: European Medicines Agency) festgelegt.

3.16

Mindestleistungsgrenze

MRPL, en: minimum required performance limit

Mindestgehalt eines Analyten in einer Probe, der mindestens nachgewiesen und bestätigt werden muss

Anmerkung 1 zum Begriff: MRPL soll die analytische Leistungsfähigkeit von Verfahren für Substanzen, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist, harmonisieren.

3.17

Referenzwert für Maßnahmen

RPA, en: reference point for action

Rückstandswert einer pharmakologisch wirksamen Substanz, die aus Kontrollgründen für bestimmte Substanzen, für die keine Rückstandshöchstmenge nach bestimmten EU-Verordnungen festgesetzt wurde, festgelegt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Die EU-Verordnung 470/2009 gilt für Rückstandshöchstmengen.

Anmerkung 2 zum Begriff: RPA beruhen derzeit auf analytischen Aspekten (d. h. der niedrigsten Konzentration, die unter Verwendung eines validierten Analysenverfahrens quantifiziert werden kann). Ziel ist es, „eine analytische Konzentration für eine nicht zugelassene pharmakologisch wirksame Substanz festzulegen, die von amtlichen Kontrolllaboren bestimmt werden kann und die niedrig genug ist, um die Verbraucher von Lebensmittelerzeugnissen, die diese Substanz enthalten, angemessen zu schützen“ [19].

3.18

positives/negatives Ergebnis

Ergebnis des Tests nach der Auswertung der Ablesung des Tests unter Berücksichtigung des (zuvor festgelegten) Cut-Off-Werts

Anmerkung 1 zum Begriff: Positives Ergebnis: Vorhandensein von Rückständen antimikrobiell wirksamer Substanzen (mikrobiologischer Hemmstofftest) oder Vorhandensein von Tierarzneimittelrückständen.

Anmerkung 2 zum Begriff: Negatives Ergebnis: Nichtvorhandensein von Rückständen antimikrobiell wirksamer Substanzen (mikrobiologischer Hemmstofftest) oder Nichtvorhandensein von Tierarzneimittelrückständen. Da es sich nur um Screening-Tests handelt, kann keine Beurteilung über „konform“ oder „nicht konform“ vorgenommen werden.

3.19

Wiederholgrenze

Wert, kleiner oder gleich dem Betrag der Differenz zwischen zwei unter Wiederholbedingungen gewonnenen Messergebnissen, der mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % erwartet wird

3.20

Nachweiswahrscheinlichkeit

POD, en: probability of detection

Anteil von positiven Untersuchungsergebnissen bei einem qualitativen Verfahren für eine gegebene Matrix bei einer gegebenen Analytmenge oder -konzentration

Anmerkung 1 zum Begriff: POD ist konzentrationsabhängig (AOAC, 2014 [7]).

4 Kurzbeschreibung

Matrixproben, die mit bekannten Mengen des Analyten dotierten wurden, werden mit dem zu validierenden oder zu verifizierenden Test untersucht, um die Nachweisempfindlichkeit, die Empfindlichkeit und die Robustheit des Tests zu bestimmen. Die Auswertung der Untersuchungsergebnisse bestimmt die Eignung der Tests für die routinemäßige Verwendung beim Screening von Milch auf das Vorhandensein von Tierarzneimittelrückständen.

ANMERKUNG Anhang B enthält Informationen über FDA-Toleranzen und/oder sichere Werte für Tierarzneimittelrückstände in der Milch.

Die Hauptanforderung an ein Screening-Verfahren ist dessen Vermögen, den betreffenden Analyten bei der gewählten Screening-Zielkonzentration zuverlässig nachzuweisen. Die Screening-Zielkonzentration sollte so gewählt werden, dass falsch-negative Ergebnisse vermieden werden, d. h. niedrig genug, um sicherzustellen, dass die Probe als „positiv gescreent“ eingestuft wird, wenn der betreffende Analyt in der Probe bei dem gesetzlichen Grenzwert vorhanden ist.

Sowohl die Validierung als auch die Verifizierung sollten den objektiven Nachweis erbringen, dass diese Hauptanforderung erfüllt ist. Die Validierung sollte die gesamten Matrix-/Tierart-/Analytenkombinationen abdecken, die im Anwendungsbereich der Standardarbeitsanweisung (SOP, en: standard operating procedure) des Verfahrens ausgewiesen werden. Die Validierung sollte so umfassend wie möglich sein, um den Anwendungsbereich aller Endanwender abzudecken.

Die Verifizierung sollte die Matrix-/Tierart-/Analytenkombinationen abdecken, die im Anwendungsbereich des durchführenden (Anwender-)Labors enthalten sind. Der Umfang der erforderlichen Validierung ist variabel, je nachdem, ob es sich um eine Validierung oder eine Verifizierung eines übertragenen Verfahrens handelt.

Die Verifizierung braucht nicht das gesamte Spektrum abzudecken, falls der Anwendungsbereich im durchführenden Labor nur begrenzt ist (z. B. einige Tierarten und keine anderen, einige Rückstände sind relevanter als andere, Rohmilch, aber keine UHT-Milch [ultrahocherhitzte Milch] usw.).

Falls ein Anwenderlabor das Verfahren für das Screening in einer anderen Matrix (IDF 2014) verwenden möchte, die nicht vom Ausgangslabor untersucht wurde, sollte das Anwenderlabor alle notwendigen Validierungsparameter untersuchen, um zu beweisen, dass das Verfahren für diese spezifische Matrix funktioniert.

5 Allgemeine Anforderungen an den Test/das Kit

Der Entwickler oder Hersteller sollte Informationen zu Methodik, Reagenzien für den Test, zusätzlichen Reagenzien, die nicht unbedingt im Kit enthalten sind, Anforderungen an die Durchführung (Informationen zum Ablesesystem, Cut-Off-Wert), sowie Festlegungen für den Test und Dokumentation (entnommen aus ISO 18330 und ISO 13969) bereitstellen. Außerdem sollte/n das Zielland/die Zielländer und dessen/ihre spezifischen gesetzlichen Grenzwerte bekannt sein, damit der Test anhand der entsprechenden gesetzlichen Grenzwerte bewertet werden kann.

Folgende Informationselemente müssen vom Hersteller/Händler/Laborleiter (im Falle eines intern entwickelten Verfahrens) vor Beginn der Validierung bereitgestellt werden:

- Testprinzip, Prinzip der Ablesung und Auswertung des Tests (einschließlich des Cut-Off-Werts oder der Berechnung des Cut-Off-Werts);
- Testformate, falls zutreffend (z. B. Ampullen/Platten);
- Anwendungsbereich des Tests:
 - für den Test geeignete Matrices: Matrices innerhalb des Anwendungsbereichs des Dokuments (siehe Abschnitt 1);
 - Tierart, die die Milch produziert;
 - Matrices mit möglichen Auswirkungen (Störwirkungen) auf das Ergebnis;
- mögliche Auswirkung der Verwendung von Probenkonservierungsmitteln;
- Spektrum des Tests: Liste von Tierarzneimitteln und erwarteten Nachweisempfindlichkeiten (sofern bekannt);
- Liste mit den aktuellen gesetzlichen Grenzwerten (RL, en: regulatory limit) für die nachweisbaren Tierarzneimittel in der (den) betreffenden Matrix (Matrices) in dem (den) jeweiligen Land (Ländern);
- ausführliche Arbeitsvorschrift in einer für das Laborpersonal verständlichen Sprache: falls je nach Matrix/Tierart geringfügige Änderungen an dem Verfahren vorgenommen werden müssen, sollten diese in der Arbeitsvorschrift für den Test (Gebrauchsanweisung) angekündigt werden.

6 Reagenzien

6.1 Rückstandsfreies Standard-Ausgangsmaterial

- Die eingesetzte Rohmilch ist eine Tankmilch, die von mindestens 4 Tieren in der Laktationsmitte stammt, die in den letzten 2 Monaten nicht mit Tierarzneimitteln behandelt wurden und Milch mit einer geringen bis mäßigen Anzahl somatischer Zellen (z. B. $< 150\,000\text{ ml}^{-1}$ bei Kuhmilch) liefern. Die Rohmilch wird in sterilen Behältern gesammelt und bei weniger als 4 °C aufbewahrt. Die maximale Dauer für die Kühllagerung der frischen Rohmilch sollte mit der lokal festgelegten Definition von frischer Rohmilch übereinstimmen.
- Die verwendete Milch sollte der normalen Milch entsprechen, die in dem betreffenden Land oder Gebiet produziert wird. Das bedeutet, dass die Zusammensetzung und Qualität der Milch annähernd der durchschnittlichen Zusammensetzung der Milch des Landes/der Region entsprechen sollten.
- In Tabelle 1 sind Beispiele von Parametern angeführt, die für „normale“ Milch berücksichtigt werden. Es ist wahrscheinlich, dass die tatsächlichen Zahlen je nach Land und Region variieren.
- Milch von mindestens 4 Tieren wird gemischt und als Probe des rückstandsfreien Standard-Ausgangsmaterials angesehen. Mindestens vier derartige Proben sollten für die Bestimmung der Nachweisempfindlichkeit bei der Untersuchung von 20 Replikaten verwendet werden. Falls 40 oder 60 Replikate untersucht werden müssen, um die Nachweisempfindlichkeit zu bestimmen, sollten acht bzw. zwölf verschiedene rückstandsfreie Milchproben verwendet werden. Mindestens vier verschiedene Milchmischungen sollten bezogen und bei Verifizierungsarbeiten (20 Replikate) verwendet werden.
- Die Verwendung von aufgetauter oder rekonstituierter lyophilisierter Milch könnte ebenfalls zugelassen werden, jedoch unter strikten Bedingungen. Die Voraussetzungsbedingung für die Arbeit mit diesen alternativen Lösungen ist der vorherige Nachweis der Gleichwertigkeit der Ergebnisse zwischen

Rohmilch und aufgetauter oder rekonstituierter lyophilisierter Milch nach der Analyse negativer und positiver Milchproben.

Tabelle 1 — Beispiele von Referenzdaten für die Zusammensetzung und Qualität normaler Milch verschiedener Tierarten

Art		SCC ^a Zellen je ml	TBC ^b KBE ^c je ml	FC ^d g/l	PC ^e g/l	pH-Wert	Antibiotika	Laktationszeit
Kuh	Zielwert	< 150 000	< 30 000	40	33	6,7 bis 6,8	Nicht- vorhanden- sein	Zwischen 60 und 200 Tagen nach dem Abkalben
	Vertretbarer Bereich	< 400 000	< 100 000	35 bis 45	30 bis 36	6,6 bis 6,9		
Ziege	Zielwert	< 2 000 000	< 60 000	38	34	6,7 bis 6,8	Nicht- vorhanden- sein	Zwischen 20 und 150 Tagen nach dem Zickeln
	Vertretbarer Bereich			30 bis 50	28 bis 40	6,6 bis 6,9		
Schaf	Zielwert	< 2 000 000	< 60 000	70	55	6,7 bis 6,8	Nicht- vorhanden- sein	Zwischen 20 und 150 Tagen nach dem Ablammen
	Vertretbarer Bereich			50 bis 90	40 bis 70	6,6 bis 6,9		

^a Gehalt an somatischen Zellen (en: somatic cell count).

^b Gesamtkeimzahl (en: total bacterial count).

^c Koloniebildende Einheiten.

^d Fettgehalt (en: fat content).

^e Eiweißgehalt (en: protein content).

6.2 Antibiotika

Für Validierungs- oder Verifizierungszwecke werden nur analysenreine oder zertifizierte Referenzmaterialien verwendet.

6.3 Standardstammlösung

- Standardstammlösungen des Antibiotikums von 100 mg/l werden in Wasser oder einem geeigneten Lösemittel hergestellt und bei weniger als 4 °C aufbewahrt (siehe 8.1) [14]. Die Haltbarkeitsdauer hängt von der Stabilität des Moleküls ab.
- Bei der Herstellung der Stammlösung wird eine Korrektur bezüglich Unreinheiten und Wassergehalt durchgeführt.
- Für jede Substanz wird eine einzelne Stammlösung hergestellt, bei bestimmten problematischen Verbindungen (zum Beispiel Probleme mit der Löslichkeit, Stabilität) sollten vorzugsweise jedoch mindestens zwei Stammlösungen hergestellt werden, um die Nachweisempfindlichkeit zu bestimmen. Eine Liste problematischer Verbindungen ist in Anhang C aufgeführt.
- Falls nur eine Stammlösung verwendet wird, sollte sie entweder aus zertifiziertem Material hergestellt oder mit einem unabhängigen physikalisch-chemischen Verfahren verifiziert werden.
- Einige Verbindungen, wie z. B. Tetracycline, sind lichtempfindlich und müssen vor Licht geschützt aufbewahrt werden. Andere Verbindungen können spezielle Anforderungen an die verwendeten Glaswaren erfordern.

6.4 Arbeitsstammlösungen

Verdünnungen von 10 mg/l bis 0,1 mg/l werden täglich frisch hergestellt.

6.5 Dotierte Probe

Für die Herstellung der Endkonzentration erfolgt die endgültige Dotierung in dem rückstandsfreien Standard-Ausgangsmaterial.

Die rückstandsfreie Milch wird mit jedem Analyten dotiert.

Das hinzugefügte Volumen der Arbeitsstammlösung sollte weniger als 5 % des Endvolumens der zu untersuchenden Milchprobe betragen.

7 Geräte und Hilfsmittel

Jedes in der Testkit-Verfahrensweise angegebene Gerät, das nicht vom Hersteller des Testkits bereitgestellt wird.

7.1 Testkit, in dem Reagenzien von mindestens zwei und vorzugsweise drei verschiedenen Produktionschargen verwendet werden.

Die Produktionschargen sollten nach dem Zufallsprinzip bestimmt werden und repräsentativ für das Produktionsvolumen des Produkts sein.

7.2 Inkubator oder Wasserbad, der/das in der Lage ist, die geeignete Bebrütungstemperatur für den Test aufrechtzuerhalten.

Falls der Hersteller über einen Inkubator verfügt, der für den Test konzipiert ist, sollte dieser Inkubator vom Hersteller zur Verwendung im Rahmen der Validierung oder Verifizierung zur Verfügung gestellt werden.

7.3 Automatisierte Lesegeräte. Falls der Hersteller ein Gerät zur Auswertung der Testergebnisse bereitstellt, sollte dieses Gerät vom Hersteller zur Verwendung und Auswertung bei der Validierung oder Verifizierung zur Verfügung gestellt werden.

Kalibrierverfahrenswesen für das automatisierte Lesegerät müssen zur Verfügung gestellt werden und alle Messwerte dürfen nur von kalibrierten Geräten stammen.

7.4 Mikropipetten, die in der Lage sind, die entsprechende, für die Verwendung im Test erforderliche Probenmenge abzugeben.

Falls das Testkit Mikropipetten oder andere Vorrichtungen zur Flüssigkeitsübertragung enthält, sollten diese vorzugsweise als Teil der Validierung oder Verifizierung evaluiert werden.

8 Probenherstellung

8.1 Herstellung der Stammlösung

Für jedes Antibiotikum wird eine 100-mg/l-Lösung hergestellt, indem zuerst die Menge an Referenzmaterial berechnet wird, die benötigt wird, um $10 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ des aktiven Wirkstoffes zu erzielen. Diese Berechnung erfolgt unter Verwendung von Gleichung (1) und den Angaben (Reinheit, Wassergehalt) aus dem Analysenzertifikat des Antibiotikums.