

DIN EN ISO 16140-3

ICS 07.100.30

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Verfahrensvalidierung –
Teil 3: Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz- und
validierten alternativen Verfahren in einem Einzel-Labor
(ISO 16140-3:2021);
Deutsche Fassung EN ISO 16140-3:2021**

Microbiology of the food chain –
Method validation –

Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in
a single laboratory (ISO 16140-3:2021);
German version EN ISO 16140-3:2021

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Validation des méthodes –

Partie 3: Protocole pour la vérification dans un seul laboratoire de méthodes de référence et
de méthodes alternatives validées (ISO 16140-3:2021);
Version allemande EN ISO 16140-3:2021

Gesamtumfang 103 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 16140-3:2021) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-12 AA „Validierung mikrobiologischer Verfahren“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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

ISO 6579-1	siehe	DIN EN ISO 6579-1
ISO 6887 (all parts)	siehe	DIN EN ISO 6887 (alle Teile)
ISO 7218	siehe	DIN EN ISO 7218
ISO 11133:2014	siehe	DIN EN ISO 11133:2020-10
ISO 11290 (all parts)	siehe	DIN EN ISO 11290 (alle Teile)
ISO 16140-1:2016	siehe	DIN EN ISO 16140-1:2016-11
ISO 16140-2:2016	siehe	DIN EN ISO 16140-2:2016-11
ISO 16140-4	siehe	DIN EN ISO 16140-4
ISO 16140-5	siehe	DIN EN ISO 16140-5
ISO 16140-6:2019	siehe	DIN EN ISO 16140-6:2020-04
ISO 17468:2016	siehe	DIN EN ISO 17468:2016-11
ISO 19036:2019	siehe	DIN EN ISO 19036:2020-05
ISO 21528-2	siehe	DIN EN ISO 21528-2
ISO/TR 6579-3	siehe	DIN CEN ISO/TR 6579-3 (DIN SPEC 10525)

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 CEN ISO/TR 6579-3 (DIN SPEC 10525), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen — Teil 3: Leitfaden für die Serotypisierung von Salmonella spp.*

DIN EN ISO 6579-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zum Nachweis, zur Zählung und zur Serotypisierung von Salmonellen — Teil 1: Nachweis von Salmonella spp.*

DIN EN ISO 6887 (alle Teile), *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen*

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

DIN EN ISO 11133:2020-10, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien (ISO 11133:2014, korrigierte Fassung 2014-11-01 + Amd. 1:2018 + Amd. 2:2020); Deutsche Fassung EN ISO 11133:2014 + A1:2018 + A2:2020*

DIN EN ISO 11290 (alle Teile), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von Listeria monocytogenes und von Listeria spp.*

DIN EN ISO 16140-1:2016-11, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 1: Terminologie (ISO 16140-1:2016); Deutsche Fassung EN ISO 16140-1:2016*

DIN EN ISO 16140-2:2016-11, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens (ISO 16140-2:2016); Deutsche Fassung EN ISO 16140-2:2016*

DIN EN ISO 16140-4, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 4: Arbeitsvorschrift für Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung*

DIN EN ISO 16140-5, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 5: Arbeitsvorschrift für eine faktorielle Ringversuch-Verfahrensvalidierung nicht urheberrechtlich geschützter Verfahren*

DIN EN ISO 16140-6:2020-04, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 6: Arbeitsvorschrift für die Validierung von (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung (ISO 16140-6:2019); Deutsche Fassung EN ISO 16140-6:2019*

DIN EN ISO 17468:2016-11, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Technische Anforderungen und Leitfaden zur Einführung oder Überarbeitung eines genormten Referenzverfahrens (ISO 17468:2016); Deutsche Fassung EN ISO 17468:2016*

DIN EN ISO 19036:2020-05, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Feststellung von Messunsicherheiten bei quantitativen Bestimmungen (ISO 19036:2019); Deutsche Fassung EN ISO 19036:2019*

DIN EN ISO 21528-2, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von Enterobacteriaceae — Teil 2: Koloniezählverfahren*

— Leerseite —

Deutsche Fassung

Mikrobiologie der Lebensmittelkette —
Verfahrensvalidierung —
Teil 3: Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz-
und alternativen Verfahren in einem Einzel-Labor
(ISO 16140-3:2021)

Microbiology of the food chain —
Method validation —
Part 3: Protocol for the verification of reference
methods and validated alternative methods in a single
laboratory (ISO 16140-3:2021)

Microbiologie de la chaîne alimentaire —
Validation des méthodes —
Partie 3: Protocole pour la vérification dans un seul
laboratoire de méthodes de référence et de méthodes
alternatives validées (ISO 16140-3:2021)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 28. Dezember 2020 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, 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	5
Vorwort	6
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	14
2 Normative Verweisungen	14
3 Begriffe	14
4 Allgemeine Prinzipien für die Verifizierung von qualitativen (Nachweis-)Verfahren und Quantifizierungsverfahren	18
4.1 Allgemeines	18
4.2 Verifizierung der Implementierung	19
4.3 Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit	19
4.4 Anforderungen an die Durchführung der Verifizierung und der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit	20
4.5 Leistungsmerkmale	23
5 Qualitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung	24
5.1 Bestimmung der geschätzten Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit (eLOD ₅₀)	24
5.2 Untersuchungsdesign	24
5.3 Auswahl von (Lebensmittel-)Einheiten	25
5.4 Künstliche Kontamination	26
5.4.1 Auswahl von Stämmen	26
5.4.2 Beimpfung der Prüfmengen	26
5.5 Beurteilung der Ergebnisse	29
5.5.1 Bestimmung von eLOD ₅₀ bei Verwendung von Arbeitsvorschrift 1	29
5.5.2 Bestimmung von eLOD ₅₀ bei Verwendung von Arbeitsvorschrift 2	31
5.5.3 Verwendung von Arbeitsvorschrift 3	34
5.6 Zulässigkeitsgrenzen	34
5.7 Ursachenanalyse	35
6 Quantitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung	35
6.1 Bestimmung der laborinternen Vergleichstandardabweichung	35
6.1.1 Allgemeines	35
6.1.2 Untersuchungsdesign	35
6.1.3 Auswahl der (Lebensmittel-)Einheit	38
6.1.4 Natürliche Kontamination	38
6.1.5 Künstliche Kontamination	38
6.1.6 Beurteilung der Ergebnisse	40
6.1.7 Zulässigkeitsgrenze	40
6.1.8 Ursachenanalyse	42
6.2 Bestimmung der geschätzten systematischen Abweichung (eBias)	43
6.2.1 Allgemeines	43
6.2.2 Untersuchungsdesign	43
6.2.3 Auswahl von (Lebensmittel-)Einheiten	43
6.2.4 Künstliche Kontamination	43

6.2.5	Beurteilung der Ergebnisse	45
6.2.6	Zulässigkeitsgrenze	45
6.2.7	Ursachenanalyse.....	46
7	Validierte alternative Bestätigungs- und Typisierungsverfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung	47
7.1	Allgemeines	47
7.2	Verifizierung der Implementierung.....	47
7.3	Untersuchungsdesign	47
7.3.1	Allgemeines	47
7.3.2	Auswahl der Stämme.....	48
7.4	Beurteilung der Ergebnisse	48
7.5	Zulässigkeitsgrenze	49
7.6	Ursachenanalyse.....	49
8	Zusammenfassung der Zulässigkeitsgrenzen zur Verifizierung validierter Verfahren....	49
Anhang A (informativ) Einteilung von (Lebensmittel-)Kategorien und vorgeschlagene Ziel-Kombinationen für Verifizierungsuntersuchungen		50
Anhang B (informativ) Anleitungen zur Auswahl anspruchsvoller (Lebensmittel-)Einheiten für die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit		70
B.1	Allgemeines	70
B.2	Zu bedenkende Matrixeffekte.....	70
B.2.1	Mikrobielle Eigenschaften	70
B.2.2	Physikalische und chemische Eigenschaften	70
B.2.3	Durch Lebensmittelverarbeitung bedingte Eigenschaften	71
B.3	Auswahl von (Lebensmittel-)Einheiten zur Verifizierung	71
Anhang C (informativ) Verifizierung des qualitativen Verfahrens — Beispiel		73
C.1	Zu verifizierendes Verfahren	73
C.2	Vorbereitung für die Verifizierung	73
C.3	Verifizierung	74
Anhang D (informativ) Verifizierung des quantitativen Verfahrens — Beispiel.....		82
D.1	Bestimmung der laborinternen Vergleichstandardabweichung — Beispiel.....	82
D.2	Bestimmung der geschätzten systematischen Abweichung (eBias) — Beispiel	83
D.2.1	Vorbereitung für die Verifizierung	83
D.2.2	Verifizierung	84
Anhang E (informativ) Verifizierung des validierten alternativen Bestätigungs- oder Typisierungsverfahrens — Beispiele.....		87
E.1	Verifizierung des alternativen Bestätigungsverfahrens — Beispiel	87
E.2	Verifizierung des alternativen Typisierungsverfahrens — Beispiel.....	88
Anhang F (normativ) Arbeitsvorschrift für die Verifizierung nicht validierter Referenzverfahren in einem Einzel-Labor		90
F.1	Allgemeines	90
F.2	Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit.....	90
F.3	Anforderungen an die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit	90
F.4	Leistungsmerkmale	94
F.5	Qualitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung eines nicht validierten Referenzverfahrens.....	95
F.5.1	Bestimmung der geschätzten Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit (eLOD ₅₀)	95
F.5.2	Untersuchungsdesign	95
F.5.3	Auswahl von (Lebensmittel-)Einheiten	95
F.5.4	Künstliche Kontamination	96
F.5.5	Beurteilung der Ergebnisse	96

F.5.6	Zulässigkeitsgrenzen.....	97
F.5.7	Ursachenanalyse.....	97
F.6	Quantitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung eines nicht validierten Referenzverfahrens.....	97
F.6.1	Bestimmung der laborinternen Vergleichstandardabweichung.....	97
F.6.2	Bestimmung der geschätzten systematischen Abweichung (eBias).....	97
F.7	Zusammenfassung der Zulässigkeitsgrenzen	98
	Literaturhinweise.....	99

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 16140-3:2021) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis August 2021, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2021 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

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 16140-3:2021 wurde von CEN als EN ISO 16140-3:2021 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 9, *Microbiology*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 463, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 16140 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

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

0.1 Die Normenreihe ISO 16140

Die Normenreihe ISO 16140 wurde erweitert, um auf die Anforderung zu reagieren, verschiedene Möglichkeiten zur Validierung oder Verifizierung von Prüfverfahren bereitzustellen. Sie folgt auf die Norm ISO 16140:2003. Die Normenreihe ISO 16140 besteht aus sechs Teilen mit dem allgemeinen Titel *Microbiology of the food chain — Method validation*:

- *Part 1: Vocabulary;*
- *Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method;*
- *Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory;*
- *Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory;*
- *Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods;*
- *Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures.*

ISO 17468 ist eine eng mit dieser Normenreihe verbundene Internationale Norm, die technische Regeln für die Entwicklung und Validierung von genormten Verfahren vorschreibt.

Bevor ein Verfahren im Labor eingesetzt werden kann, ist im Allgemeinen ein zweistufiger Prozess erforderlich.

- Die erste Stufe umfasst die Validierung des Verfahrens. Die Validierung erfolgt durch eine Einzellabor-Untersuchung gefolgt von einem Ringversuch (siehe ISO 16140-2, ISO 16140-5 und ISO 16140-6). Für den Fall, dass ein Verfahren innerhalb eines einzelnen Labors validiert wird (siehe ISO 16140-4), erfolgt kein Ringversuch.
- Die zweite Stufe besteht aus der Verifizierung des Verfahrens. Hier wird von einem Labor gezeigt, dass es das validierte Verfahren zufriedenstellend durchführen kann. Dies wird in diesem Dokument (d. h. ISO 16140-3) beschrieben. Die Verifizierung ist ausschließlich für Verfahren anwendbar, die durch einen Ringversuch validiert wurden.

Grundsätzlich werden zwei Arten von Verfahren unterschieden: Referenzverfahren und alternative Verfahren.

Der Begriff „Referenzverfahren“ ist in ISO 16140-1:2016, 2.59, definiert als „international anerkanntes und in hohem Maße akzeptiertes Verfahren“. In der Anmerkung zum Begriff wird erläutert, dass es sich um „ISO-Normen und Normen, welche gemeinsam durch ISO und CEN veröffentlicht wurden oder andere regionale/nationale Normen von gleichwertigem Rang“ handelt.

In der Normenreihe ISO 16140 umfasst der Begriff „Referenzverfahren“ auch genormte Referenz-(ISO- und CEN-)Verfahren nach der Definition in ISO 17468:2016, 3.5, wonach es sich um ein „in einer Norm beschriebenes Referenzverfahren“ handelt.

Der Begriff „alternatives Verfahren“ (zur Validierung vorgelegtes Verfahren) ist in ISO 16140-1:2016, 2.4, definiert als „Untersuchungsverfahren, das bei einer bestimmten Kategorie von Produkten den gleichen Analyt nachweist oder quantitativ bestimmt, der mit dem entsprechenden Referenzverfahren bestimmt wird“. In der Anmerkung zum Begriff wird erläutert: „Das Verfahren kann urheberrechtlich geschützt sein. Die

Verwendung des Begriffs ‚alternativ‘ bezieht sich auf das gesamte ‚System von Prüfverfahren und Reaktionen‘. Der Begriff schließt alle materiellen oder sonstigen Bestandteile, die zur Durchführung des Verfahrens erforderlich sind, ein.“.

ISO 16140-4 befasst sich mit der Validierung in einem Einzel-Labor. Die Ergebnisse gelten daher nur für das Labor, in dem die Untersuchung durchgeführt wurde. In diesem Fall ist eine Verifizierung (wie in diesem Dokument beschrieben) nicht anwendbar. ISO 16140-5 beschreibt Arbeitsvorschriften für nicht urheberrechtlich geschützte Verfahren, bei denen eine schnellere Validierung erforderlich ist, oder bei denen es um die Validierung eines hoch spezialisierten Verfahrens geht und die Anzahl der nach ISO 16140-2 erforderlichen Labore nicht erreicht werden kann. ISO 16140-4 und ISO 16140-5 können für die Validierung mit Bezug auf ein Referenzverfahren verwendet werden. ISO 16140-4 (qualitativ und quantitativ) und ISO 16140-5 (nur quantitativ) können ebenfalls für die Validierung ohne Bezug auf ein Referenzverfahren verwendet werden.

Das Flussdiagramm in Bild 1 gibt einen Überblick über die Verknüpfungen zwischen den unterschiedlichen oben genannten Teilen. Darüber hinaus enthält es Anweisungen für den Anwender zur Auswahl des richtigen Teils der Normenreihe ISO 16140. Dabei werden auch der Zweck der Untersuchung und die oben angegebenen Anmerkungen berücksichtigt.

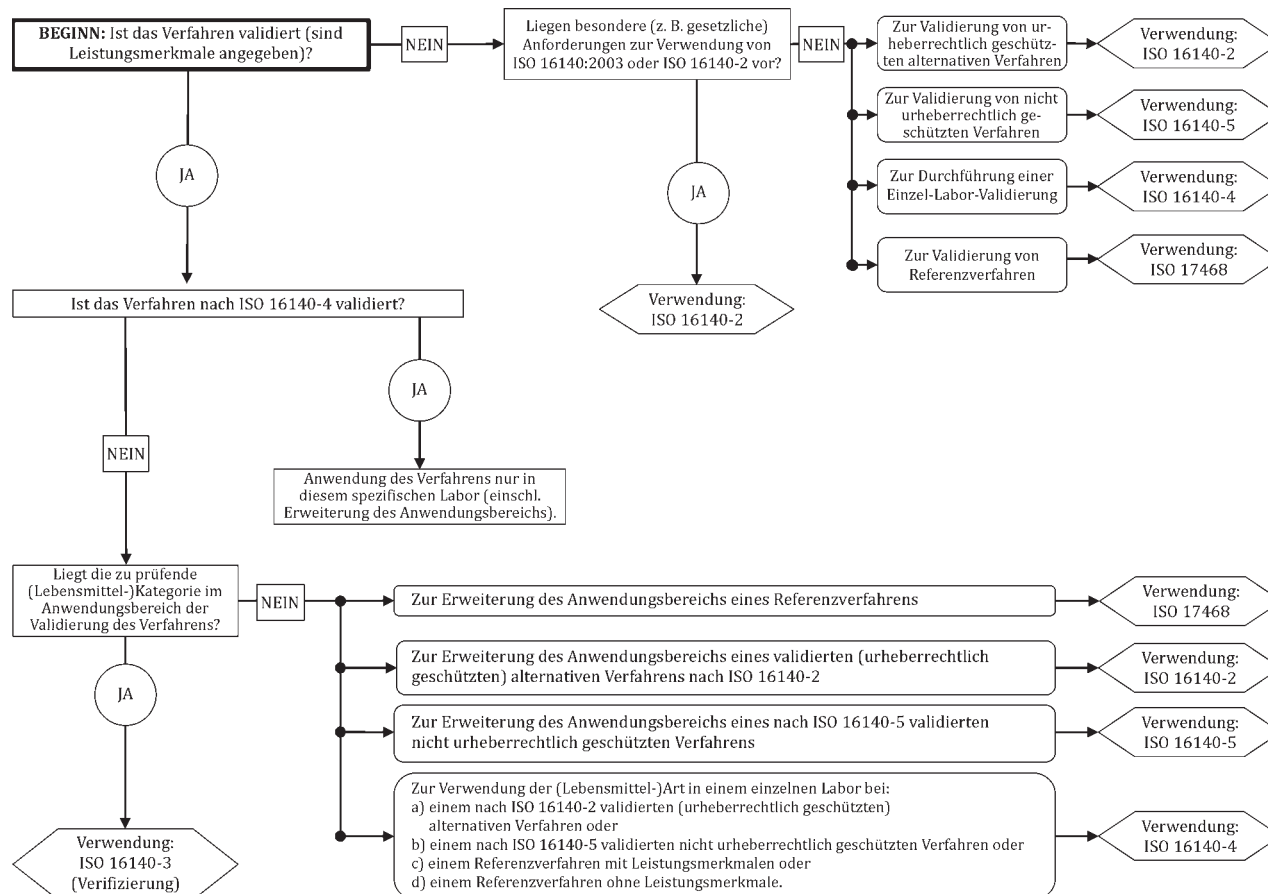


Bild 1 — Flussdiagramm zur Anwendung der Normenreihe ISO 16140

ANMERKUNG 1 Zur Verbesserung der Lesbarkeit werden in diesem Dokument die Begriffe „Kategorie“, „Art“ und/oder „Einheit“ bisweilen mit dem Begriff „(Lebensmittel)“ kombiniert. Allerdings kann der Begriff „(Lebensmittel)“ nach den Angaben in Abschnitt 1 hierbei durch den Begriff „(Futtermittel)“ und die Begriffe aus anderen Bereichen der Lebensmittelkette ausgetauscht werden.

ANMERKUNG 2 Das allgemeine Prinzip für die Verifizierung des Verfahrens besteht darin, dass das zu verifizierende Verfahren (entweder alternatives oder Referenzverfahren) validiert worden ist. Einige Referenzverfahren (einschließlich

ISO- oder CEN-Normen) sind jedoch noch nicht (vollständig) validiert. Zur Verifizierung dieser Verfahren werden die Arbeitsvorschriften in Anhang F beschrieben.

ISO 16140-6 unterscheidet sich insofern ein wenig von den anderen Teilen der Normenreihe ISO 16140, als sie sich auf eine sehr spezifische Situation bezieht, bei der lediglich die Bestätigungsprüfung des Verfahrens zu validieren ist [z. B. die biochemische Bestätigung von *Enterobacteriaceae* (siehe ISO 21528-2)]. Bei der Bestätigungsprüfung wird ein angenommenes (vermutliches) Ergebnis in ein bestätigtes positives Ergebnis umgesetzt. Die Validierung alternativer Typisierungsverfahren (z. B. bei der Serotypisierung von *Salmonella*) ist ebenfalls in ISO 16140-6 enthalten. Für die Validierungsuntersuchung nach ISO 16140-6 ist eindeutig definiert, mit welchem selektiven Agarmedium/mit welchen selektiven Agarmedien Stämme mithilfe des alternativen Bestätigungsverfahrens bestätigt werden können. Bei erfolgreicher Validierung kann das alternative Bestätigungsverfahren nur dann verwendet werden, wenn die Stämme auf einem Agarmedium wiedergefunden werden, das in der Validierungsuntersuchung verwendet und als akzeptabel nachgewiesen wurde. Bild 2 zeigt Fälle auf, in denen ein alternatives, nach ISO 16140-6 validiertes Bestätigungsverfahren angewendet werden kann (siehe Text in Kästen).

Referenzverfahren



Nach ISO 16140-2 validiertes alternatives Verfahren



Bild 2 — Verwendung von validierten alternativen Bestätigungsverfahren (siehe ISO 16140-6)

BEISPIEL Im Folgenden ist ein Anwendungsbeispiel für ein validiertes alternatives Bestätigungsverfahren beschrieben.

Ein auf ELISA basierendes alternatives Bestätigungsverfahren wurde validiert, um die biochemische Bestätigung von *Salmonella*, wie in ISO 6579-1 beschrieben, zu ersetzen. Für die Validierungsuntersuchung wurden XLD-Agar (zwingend erforderliches Agarmedium nach ISO 6579-1) sowie Brillantgrün-Agar (BGA) und ein festgelegtes chromogenes Agarmedium (zwei optionale Agarmedien für die sekundäre Plattierung nach ISO 6579-1) als Agarmedien für den Beginn der Bestätigung verwendet. Unter den folgenden Bedingungen kann das validierte Bestätigungsverfahren als Ersatz für die biochemische Bestätigung verwendet werden:

- von Laboren, die ISO 6579-1 anwenden; oder
- von Laboren, die ein nach ISO 16140-2 validiertes alternatives Verfahren mit Verweisung auf ISO 6579-1 für die Bestätigung anwenden; oder
- von Laboren, die ein nach ISO 16140-2 validiertes alternatives Verfahren anwenden, bei dem die Bestätigung mit einem XLD-Agar und/oder BGA und/oder dem festgelegten chromogenen Agarmedium beginnt.

Unter den folgenden Bedingungen kann das validierte Bestätigungsverfahren nicht verwendet werden:

- von Laboren, die ein nach ISO 16140-2 validiertes alternatives Verfahren anwenden, das für den Beginn der Bestätigung nur auf andere Agarmedien verweist als die in der Validierung enthaltenen (z. B. nur Hektoen-Agar und SS-Agar); oder
- von Laboren, die ein nach ISO 16140-2 validiertes alternatives Verfahren anwenden, das nur auf ein Bestätigungsverfahren verweist, das keine Isolierung auf einem Agarmedium erfordert.

0.2 Verifizierung im Vergleich zu Validierung

ISO 16140-1:2016 definiert die Begriffe für Validierung und Verifizierung wie folgt:

- **Validierung:** Ermittlung der Leistungsmerkmale eines Verfahrens und Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die Leistungsanforderungen für eine festgelegte vorgesehene Anwendung erfüllt sind;
- **Verifizierung:** Nachweis, dass ein validiertes Verfahren bei der Anwendung durch den Anwender nach den in der Validierungsuntersuchung bestimmten Verfahrensspezifikationen funktioniert und gebrauchstauglich ist.

ANMERKUNG 1 Mit Anwender ist das Anwenderlabor gemeint.

Die Verifizierung des Verfahrens gilt für Verfahren, die:

- Referenzverfahren sind, einschließlich ISO- oder CEN-Normen, die mindestens durch einen Ringversuch validiert werden;

ANMERKUNG 2 Einige Referenzverfahren (einschließlich ISO- oder CEN-Normen) sind jedoch noch nicht (vollständig) validiert. Zur Verifizierung dieser Verfahren werden die Arbeitsvorschriften in Anhang F beschrieben.

- alternative Verfahren, urheberrechtlich geschützte oder andere sind, wenn die Validierung einen Ringversuch einschloss. Dieses Verfahren wurde validiert nach
 - ISO 16140-2 für alternative (urheberrechtlich geschützte) Verfahren,
 - ISO 16140-5 für nicht urheberrechtlich geschützte Verfahren oder
 - ISO 16140-6 für alternative (urheberrechtlich geschützte) Bestätigungs- und Typisierungsverfahren.

In einer Validierungsuntersuchung ist es nicht möglich, alle vorhandenen Lebensmittel zu prüfen; die Vielfalt und Anzahl der in einer Validierungsuntersuchung verwendeten Proben ist begrenzt. In den meisten Fällen basiert die Validierung auf fünf verschiedenen Lebensmittelkategorien (Kategorien wie in ISO 16140-1:2016, 2.11, definiert und in ISO 16140-2:2016, Anhang A, angegeben). Manchmal wird die Validierung durch zusätzliche (andere) Kategorien wie Heimtierfutter und Futtermittel, Umgebungsproben (Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion) und/oder Proben aus dem Bereich der Primärproduktion ergänzt.

Wenn mindestens fünf verschiedene Lebensmittelkategorien validiert sind, gilt das Verfahren als validiert für ein „Breites Spektrum von Lebensmitteln“. Und obwohl während der Validierungsuntersuchung nur fünf Lebensmittelkategorien geprüft werden, wird erwartet, dass das Verfahren für jede Art von Lebensmittelproben innerhalb der 15 Lebensmittelkategorien in ISO 16140-2: 2016, Anhang A, funktioniert. Mit anderen Worten, der „Anwendungsbereich“ der Validierung des Verfahrens ist ein breites Spektrum von Lebensmitteln, das den 15 Lebensmittelkategorien in ISO 16140-2:2016, Anhang A, entspricht. Der Anwendungsbereich der Validierung ist wichtig für die Auswahl der Kategorien, Arten und Einheiten für die Verifizierung.

Es werden zwei Arten von Verifizierung unterschieden:

- Die erste heißt **Verifizierung der Implementierung**. Es soll nachgewiesen werden, dass das Anwenderlabor in der Lage ist, das Verfahren fehlerfrei durchzuführen. Das Anwenderlabor prüft eine (Lebensmittel-)Einheit, die in der Validierungsuntersuchung verwendet wurde (bei qualitativen Verfahren), und jede (Lebensmittel-)Einheit im Anwendungsbereich der Validierung (bei quantitativen Verfahren). Anschließend wird das Ergebnis der Verifizierung mit dem Ergebnis der Validierung verglichen.
- Die zweite heißt **Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit**. Es soll nachgewiesen werden, dass das Anwenderlabor in der Lage ist, die von ihm beanspruchten (Lebensmittel-)Einheiten im Anwendungsbereich der Laboranwendung zu prüfen. Das Anwenderlabor prüft die in den Anwendungsbereich der Validierung fallenden (Lebensmittel-)Einheiten, die üblicherweise vom Anwender untersucht werden. Da nicht alle (Lebensmittel-)Einheiten in die Verifizierung einbezogen werden können, wird das Anwenderlabor aufgefordert, anspruchsvolle (Lebensmittel-)Einheiten zu prüfen.

Der Anwendungsbereich legt fest, auf welche (Gruppe von) Produkte(n) – Kategorien, Arten oder Einheiten – das Verfahren angewendet werden kann. Es werden verschiedene Anwendungsbereiche unterschieden:

- **Anwendungsbereich des Verfahrens:** (Gruppe von) Produkte(n) – Kategorien, Arten oder Einheiten – für die das Verfahren anwendbar sein soll.
- **Anwendungsbereich der Validierung:** (Gruppe von) Produkte(n) – Kategorien, Arten oder Einheiten – für die die Anwendbarkeit des Verfahrens validiert werden soll.

ANMERKUNG Der Anwendungsanspruch der Validierung ist in den meisten Fällen weiter gefasst als die Produkte, die in der Validierungsuntersuchung selbst enthalten sind. Beispielsweise im Fall von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren, die nach ISO 16140-2:2016 validiert wurden: Wenn mindestens fünf (≥ 5) Lebensmittelkategorien – unter Verwendung von mindestens drei verschiedenen Lebensmittelarten je Kategorie – in der Validierungsuntersuchung geprüft wurden, dann ist der Anwendungsbereich der Validierung ein „Breites Spektrum von Lebensmitteln“ (sodass alle 15 Lebensmittelkategorien im Validierungsbereich beansprucht werden). Wenn weniger als fünf (< 5) Lebensmittelkategorien geprüft wurden, ist der Anwendungsbereich der Validierung auf die in die Validierung aufgenommenen Lebensmittelkategorien beschränkt.

- **Anwendungsbereich der Laboranwendung:** (Gruppe von) Produkte(n) – Kategorien, Arten oder Einheiten – für die das Verfahren vom Labor verwendet werden soll und die in den Anwendungsbereich der Validierung fallen.

Die Überlappung zwischen den verschiedenen Anwendungsbereichen (einschließlich eines Beispiels) ist in Bild 3 dargestellt.

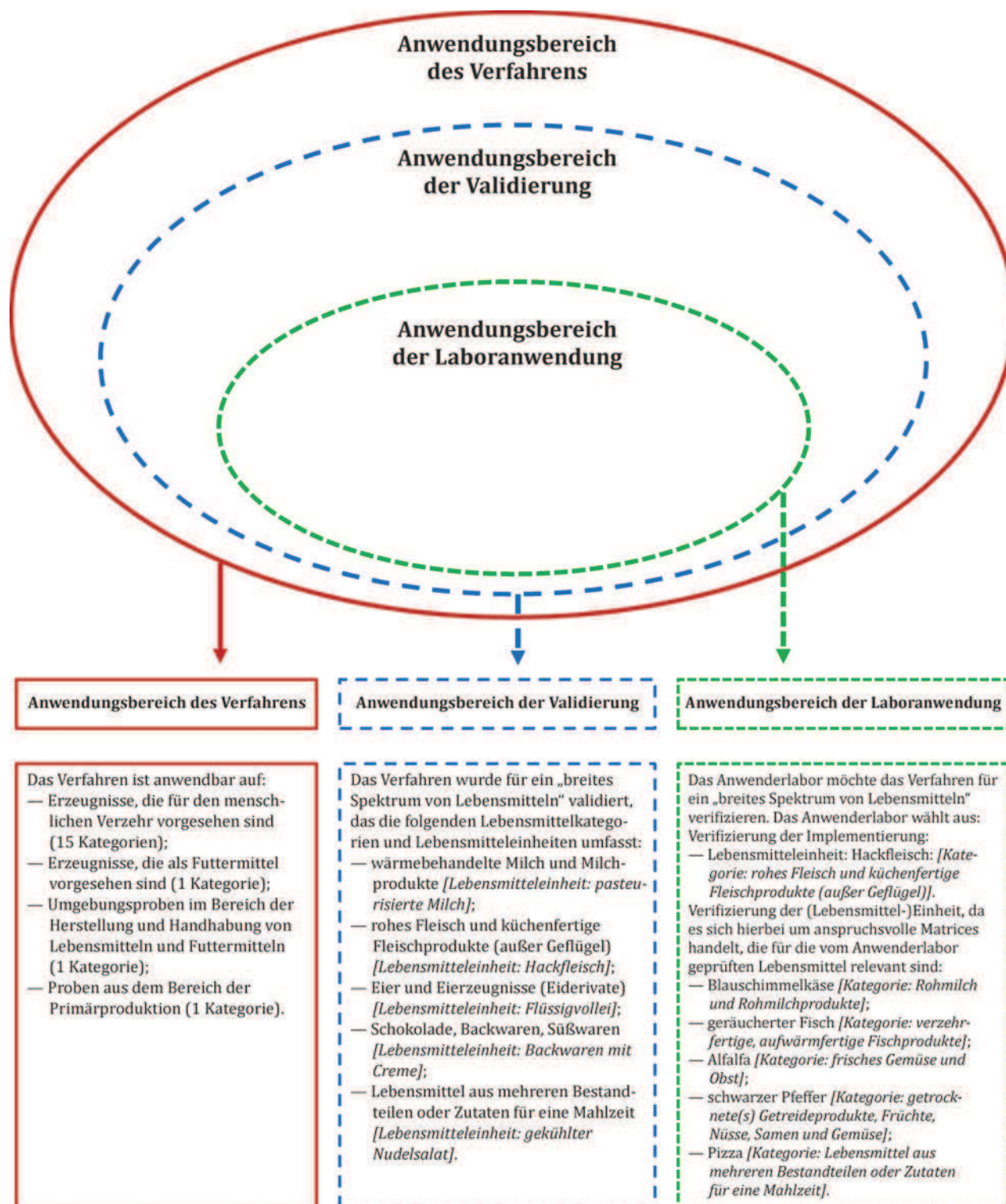


Bild 3 — Überlappung zwischen den verschiedenen Anwendungsbereichen (einschließlich eines Beispiels)

Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieses Dokuments (d.h. ISO 16140-3:2021) sind einige Referenzverfahren noch nicht (vollständig) validiert und würden daher nicht in den Anwendungsbereich dieses Dokuments fallen. Es wird anerkannt, dass Normungsinstitute (einschließlich der ISO- und CEN-Komitees) Zeit brauchen werden, um ihre Referenzverfahren zu validieren. Daher werden diese nicht validierten Referenzverfahren (einschließlich ISO- oder CEN-Normen) in einem Anwenderlabor nach einer bestimmten Arbeitsvorschrift (siehe Anhang F) verifiziert. Dies wird als eine vorübergehende Situation angesehen, bis diese Verfahren von den ISO- und/oder CEN-Komitees validiert sind. Für weiterführende Informationen siehe Literaturhinweis [13].

In diesem Dokument:

- gibt „muss“ eine Anforderung an;
- gibt „sollte“ eine Empfehlung an;
- gibt „darf“ eine Zulässigkeit an;
- gibt „kann“ eine Möglichkeit oder ein Vermögen an.

Als „ANMERKUNG“ gekennzeichnete Informationen dienen als Anleitung zum Verständnis oder der Erläuterung des zugehörigen Satzes.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt die Arbeitsvorschrift fest, die bei der Verifizierung von Referenzverfahren und von validierten alternativen Verfahren zur Umsetzung im Anwenderlabor eingesetzt werden.

Dieses Dokument ist anwendbar auf die Verifizierung von Verfahren zur Untersuchung (Nachweis bzw. quantitative Bestimmung), Bestätigung und Typisierung von Mikroorganismen in:

- Erzeugnissen, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind;
- Erzeugnissen, die als Futtermittel vorgesehen sind;
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und Handhabung von Lebensmitteln und Futtermitteln;
- Proben aus dem Bereich der Primärproduktion.

Dieses Dokument gilt insbesondere für Bakterien und Pilze. Einige Abschnitte können auf andere (Mikro-)Organismen oder deren Metaboliten angewendet werden. Die Bestimmung muss im Einzelfall erfolgen.

Die technischen Arbeitsvorschriften für die Verifizierung validierter qualitativer Verfahren und validierter quantitativer Verfahren sind in Abschnitt 5 und Abschnitt 6 beschrieben. Die technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von validierten alternativen Bestätigungs- und Typisierungsverfahren ist in Abschnitt 7 beschrieben. Die Arbeitsvorschriften für die Verifizierung von nicht validierten Referenzverfahren werden in Anhang F beschrieben.

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 6887 (all parts), *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

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

ISO 16140-1:2016, *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 1: Vocabulary*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 16140-1 und 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 <http://www.electropedia.org/>

3.1

alternatives Bestätigungs- oder Typisierungsverfahren

zur Validierung vorgelegtes Bestätigungs- oder Typisierungsverfahren

Analyseverfahren, mit dem derselbe Analyt bestätigt oder typisiert wird wie mit dem entsprechenden Referenzverfahren

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Verfahren kann urheberrechtlich geschützt sein. Die Verwendung des Begriffs „alternativ“ bezieht sich auf das gesamte „System von Prüfverfahren und Reaktion“. Der Begriff schließt alle materiellen oder sonstigen Bestandteile ein, die zur Durchführung des Verfahrens erforderlich sind.

[QUELLE: ISO 16140-6:2019, 3.2, modifiziert — Anmerkung 2 zum Begriff wurde gelöscht; in der Deutschen Fassung wurde „dasselbe“ zu „derselbe“ korrigiert.]

3.2

systematische Abweichung

systematische Abweichung von Messungen

Schätzwert eines systematischen Messfehlers oder die systematische Differenz zwischen dem quantitativen zugewiesenen Wert und dem Mittelwert der Ergebnisse von Wiederholungsmessungen

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.9]

3.3

(Lebensmittel-)Kategorie

Gruppe von *(Lebensmittel-)Arten* (3.18) gemeinsamer Herkunft

BEISPIEL Lebensmittelkategorie: wärmebehandelte Milch und Milcherzeugnisse. Lebensmittelart: pasteurisierte Milcherzeugnisse. Lebensmitteleinheit: Dessertcreme.

Anmerkung 1 zum Begriff: Die (Lebensmittel-)Kategorien sind in Anhang A aufgeführt.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.11, modifiziert — Im Begriff wurde „(Lebensmittel-)“ vor „Kategorie“ hinzugefügt. In der Definition hat „(Lebensmittel-)“ das Wort „Probe“ ersetzt. Das Beispiel wurde geändert, um es an die in Anhang A verwendeten Begriffe anzupassen. Anmerkung 1 zum Begriff wurde hinzugefügt.]

3.4

geschätzte systematische Abweichung

eBias, en: estimated bias

Bestimmung der *systematischen Abweichung* (3.2) auf der Grundlage des in diesem Dokument (d. h. ISO 16140-3) beschriebenen Untersuchungsdesigns

Anmerkung 1 zum Begriff: Eine genaue Bestimmung der systematischen Abweichung ist nicht möglich, da die Anzahl der untersuchten Proben klein ist. Aus diesem Grund wird in diesem Dokument der Begriff „geschätzte systematische Abweichung“ („eBias“) verwendet.

3.5

geschätzte Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit

eLOD₅₀, en: estimated LOD₅₀ (level of detection)

Bestimmung der LOD₅₀ (Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit) auf der Grundlage des in diesem Dokument beschriebenen Untersuchungsdesigns

Anmerkung 1 zum Begriff: Eine genaue Bestimmung der LOD₅₀ ist nicht möglich, da die Anzahl der untersuchten Proben im Vergleich zu der in ISO 16140-2:2016 geforderten Anzahl von Proben zu klein ist. Aus diesem Grund wird der Begriff „geschätzte Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit“ („eLOD₅₀“) in diesem Dokument verwendet.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die LOD₅₀ ist in ISO 16140-1:2016, 2.35, festgelegt.

3.6

Untersuchung zur Ausschlusssicherheit (Exklusivität)

Untersuchung unter Verwendung reiner *Nicht-Zielstämme* (3.11), die möglicherweise zu einer Kreuzreaktion fähig sind, von denen nicht erwartet wird, dass sie bei Anwendung des alternativen Verfahrens nachgewiesen oder gezählt werden

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.22]

3.7

Untersuchung zum Maß der spezifischen Erfassung (Inklusivität)

Untersuchung unter Verwendung reiner *Zielstämme* (3.15), die bei Anwendung des alternativen Verfahrens nachgewiesen oder gezählt werden

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.31]

3.8

(Lebensmittel-)Einheit

ein einzelnes festgelegtes Lebensmittel, Futtermittel, eine einzelne festgelegte Umgebungsprobe oder *Matrix* (3.10) aus der Primärproduktion

BEISPIEL Lebensmittelkategorie: wärmebehandelte Milch und Milcherzeugnisse. Lebensmittelart: pasteurisierte Milcherzeugnisse. Lebensmitteleinheit: Dessertcreme.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.34, modifiziert — In der Benennung wurde „(Lebensmittel-)“ vor „Einheit“ hinzugefügt. Das Beispiel wurde geändert, um es an die in Anhang A verwendeten Begriffe anzupassen.]

3.9

Laborprobe

Probe, die zum Versand an das Labor vorbereitet und zur Kontrolle oder Prüfung vorgesehen ist

[QUELLE: ISO 6887-1:2017, 3.1]

3.10

Matrix

alle Komponenten der Probe

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.38, modifiziert — In der Benennung wurde „(Produkt)“ gelöscht.]

3.11

Nicht-Zielstamm

Stamm, der in Übereinstimmung mit dem Anwendungsbereich des Referenzverfahrens festgelegt ist, von dem nach vernünftigem Ermessen nicht erwartet wird, dass er bei Anwendung des alternativen Verfahrens bestätigt, nachgewiesen oder gezählt wird

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.44, modifiziert — In der Definition wurde „bestätigt“ zu „nachgewiesen oder gezählt“ hinzugefügt.]

3.12

Referenzmaterial

Material, das ausreichend homogen und bezüglich einer oder mehrerer bestimmter Eigenschaften stabil ist und von dem festgestellt wurde, dass es für seinen Verwendungszweck bei einer Messung geeignet ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Eigenschaften können qualitativ oder quantitativ sein, z. B. Feststellung von Substanzen oder Spezies.

Anmerkung 2 zum Begriff: Verwendungszwecke dürfen Kalibrierung eines Messsystems, Beurteilung eines Messverfahrens, Zuweisung von Werten zu anderen Materialien und Qualitätskontrollen sein.

[QUELLE: ISO Guide 30:2015, 2.1.1, modifiziert — Die ursprünglichen Anmerkungen 1 und 4 zum Begriff wurden gestrichen und die Anmerkungen neu nummeriert.]

3.13

Anwendungsbereich der Laboranwendung

Kategorien, Matrices, Analyten und Konzentrationen für ein analytisches Verfahren, für das ein *Anwenderlabor* (3.19) eine zufriedenstellende Prüfung im eigenen Labor beansprucht

Anmerkung 1 zum Begriff: Ein Verfahren wurde unter Umständen in einem breiteren Anwendungsbereich von Analyten, Matrices und Konzentrationen validiert als der Anwendungsbereich, der vom Anwenderlabor angegeben wird. Der Anwendungsbereich der Laboranwendung ist kleiner als oder gleich dem *Anwendungsbereich der Validierung* (3.14).

3.14

Anwendungsbereich der Validierung

die Kategorien, Matrices, Analyten und Konzentrationen, auf die ein validiertes Analyseverfahren zufriedenstellend angewendet werden kann

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.70, modifiziert — „Kategorien“ wurde hinzugefügt und „Matrices“ wurde vor „Analyten“ verschoben.]

3.15

Zielstamm

Stamm, der in Übereinstimmung mit dem Anwendungsbereich des Referenzverfahrens festgelegt ist, von dem erwartet wird, dass er bei Anwendung des alternativen Verfahrens bestätigt, nachgewiesen oder gezählt wird

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.74, modifiziert — In der Definition wurde „bestätigt“ zu „nachgewiesen oder gezählt“ hinzugefügt.]

3.16

Prüfmenge

aus der *Laborprobe* (3.9) entnommene, abgemessen (Volumen oder Masse) repräsentative Probe zur Verwendung bei der Herstellung der Erstverdünnung

Anmerkung 1 zum Begriff: Manchmal ist vor der Entnahme der Prüfmenge die Herstellung einer *Untersuchungsprobe* (3.17) aus einer Laborprobe erforderlich, dies wird bei mikrobiologischen Untersuchungen jedoch selten angewendet.

[QUELLE: ISO 6887-1:2017, 3.5, modifiziert — In der Anmerkung 1 zum Begriff wurde „eine Untersuchungsprobe aus“ vor „die Laborprobe“ hinzugefügt.]

3.17

Untersuchungsprobe

aus der *Laborprobe* (3.9) nach der im Prüfverfahren festgelegten Verfahrensweise hergestellte Probe, von der die *Prüfmengen* (3.16) entnommen werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Herstellung der Laborprobe vor der Entnahme der Prüfmenge wird bei mikrobiologischen Untersuchungen selten angewendet.

Anmerkung 2 zum Begriff: Bei Bestätigungs- und Typisierungsverfahren ist die Probe eine isolierte Kolonie auf definierten selektiven oder nicht-selektiven Agarplatten.

[QUELLE: ISO 6887-1:2017, 3.4, modifiziert — In der Definition wurde „Verfahren der Prüfung“ durch „Prüfverfahren“ ersetzt und Anmerkung 2 zum Begriff hinzugefügt.]

3.18

(Lebensmittel-)Art

für eine gegebene *(Lebensmittel-)Kategorie* (3.3), eine Gruppe von *(Lebensmittel-)Einheiten* (3.8), die auf ähnliche Weise verarbeitet wurden, mit ähnlichen (intrinsischen) Merkmalen und einer ähnlichen mikrobiellen Ökologie

BEISPIEL Lebensmittelkategorie: wärmebehandelte Milch und Milcherzeugnisse. Lebensmittelart: pasteurisiertes Milcherzeugnis.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.78, modifiziert — In der Benennung und in der Definition wurde „(Lebensmittel-)“ vor „Art“, „Kategorie“ und „Einheiten“ hinzugefügt.]

3.19

Anwenderlabor

Labor, in dem ein validiertes alternatives Verfahren bzw. ein validiertes Referenzverfahren durchgeführt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Einige Referenzverfahren (einschließlich ISO- oder CEN-Normen) sind noch nicht (vollständig) validiert. Zur Verifizierung dieser Verfahren werden die Arbeitsvorschriften in Anhang F beschrieben.

3.20

Validierung

Ermittlung der Leistungsmerkmale eines Verfahrens und Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die Leistungsanforderungen für eine festgelegte vorgesehene Anwendung erfüllt sind

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.81]

3.21

Verifizierung

Nachweis, dass ein validiertes Verfahren bei der Anwendung durch den Anwender die in der *Validierungsuntersuchung* (3.20) bestimmten Verfahrensspezifikationen erfüllt und für den vorgesehenen Zweck geeignet ist

Anmerkung 1 zum Begriff: Einige Referenzverfahren (einschließlich ISO- oder CEN-Normen) sind noch nicht (vollständig) validiert. Zur Verifizierung dieser Verfahren werden die Arbeitsvorschriften in Anhang F beschrieben.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.83, modifiziert — In der Definition hat „erfüllt“ das Wort „funktioniert“ ersetzt, und „gebrauchstauglich“ wurde durch „für den vorgesehenen Zweck geeignet“ ersetzt. Anmerkung 1 zum Begriff wurde ersetzt.]

4 Allgemeine Prinzipien für die Verifizierung von qualitativen (Nachweis-)Verfahren und Quantifizierungsverfahren

4.1 Allgemeines

Die Verifizierung von qualitativen (Nachweis-)Verfahren und Quantifizierungsverfahren findet in zwei Schritten statt:

- Verifizierung der Implementierung;
- Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit.

Bei der Verifizierung liegt der Schwerpunkt auf den (Lebensmittel-)Einheiten, die im Anwendungsbereich der Validierung und im Anwendungsbereich der Laboranwendung liegen.

Bevor eine Verifizierung des Verfahrens durchgeführt wird, muss sich das Anwenderlabor auf den/die Validierungsbericht(e), der/die von anerkannten Normungsinstituten und/oder

Verfahrenszertifizierungsstellen veröffentlicht wird/werden, als Quelle(n) für den Anwendungsbereich der Validierung und zur Auswahl geeigneter (Lebensmittel-)Einheiten für die Verifizierung beziehen.

Die Verifizierung der Implementierung erfolgt vor der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit. Die technischen Regeln für die Durchführung der Verifizierung der Implementierung und der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit sind in Abschnitt 5 für qualitative Verfahren und in Abschnitt 6 für quantitative Verfahren enthalten.

Zur Verifizierung nicht validierter Referenzverfahren muss das Anwenderlabor die technischen Arbeitsvorschriften wie in Anhang F beschrieben verwenden.

4.2 Verifizierung der Implementierung

Die Verifizierung der Implementierung dient dazu, die Kompetenz des Anwenderlabors zur Durchführung des validierten Verfahrens darzustellen. Dies wird durch seine Fähigkeit erreicht, die erwarteten Ergebnisse bei einer (Lebensmittel-)Einheit zu erzielen.

Das Anwenderlabor muss folgende Schritte ausführen:

- Prüfung der Validierungsdaten für das betreffende Verfahren;
- für qualitative Verfahren:
 - Auswahl einer (Lebensmittel-)Einheit, die während der Validierungsuntersuchung geprüft wurde und in den Anwendungsbereich der Laboranwendung des Anwenderlabors fällt;
 - wenn die in der Validierungsuntersuchung aufgenommenen (Lebensmittel-)Einheiten nicht in den Anwendungsbereich der Laboranwendung des Anwenderlabors gehören, muss das Anwenderlabor sich eine der (Lebensmittel-)Einheiten beschaffen; dies ist notwendig, da die Nachweisgrenze des Verfahrens durch die (Lebensmittel-)Einheit beeinflusst wird;
 - Nutzung dieser ausgewählten (Lebensmittel-)Einheit und der während der Validierungsuntersuchung verwendeten Probengröße zur Durchführung der Verifizierung der Implementierung;
- für quantitative Verfahren: Auswahl einer beliebigen (Lebensmittel-)Einheit, die in den Anwendungsbereich der Validierung des Verfahrens gehört (aber nicht unbedingt während der Validierung geprüft wurde).

4.3 Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit

Ziel der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit ist der Nachweis, dass das Anwenderlabor für die Durchführung des validierten Verfahrens mit im Anwenderlabor geprüften (Lebensmittel-)Einheiten kompetent ist.

Das Anwenderlabor muss folgende Schritte ausführen:

- Auswahl einer anspruchsvollen (Lebensmittel-)Einheit aus jeder im Anwendungsbereich der Validierung aufgeführten (Lebensmittel-)Kategorie (Einzelheiten siehe 4.4), die auch eine im Anwendungsbereich der Laboranwendung des Anwenderlabors geprüfte (Lebensmittel-)Kategorie ist;
- Nutzung dieser (Lebensmittel-)Einheit und der während der Validierungsuntersuchung verwendeten Probengröße (oder einer kleineren Probengröße, falls routinemäßig im Anwenderlabor verwendet) bei der Durchführung der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit.

4.4 Anforderungen an die Durchführung der Verifizierung und der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit

Bild 4, Bild 5 und Bild 6 zeigen die Anzahl der (Lebensmittel-)Einheiten, die unter unterschiedlichen Bedingungen für die Verifizierung der Implementierung und die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit erforderlich sind. Bild 4 und Bild 5 beziehen sich nur auf Lebensmittelkategorien. Bild 6 enthält weitere Kategorien.

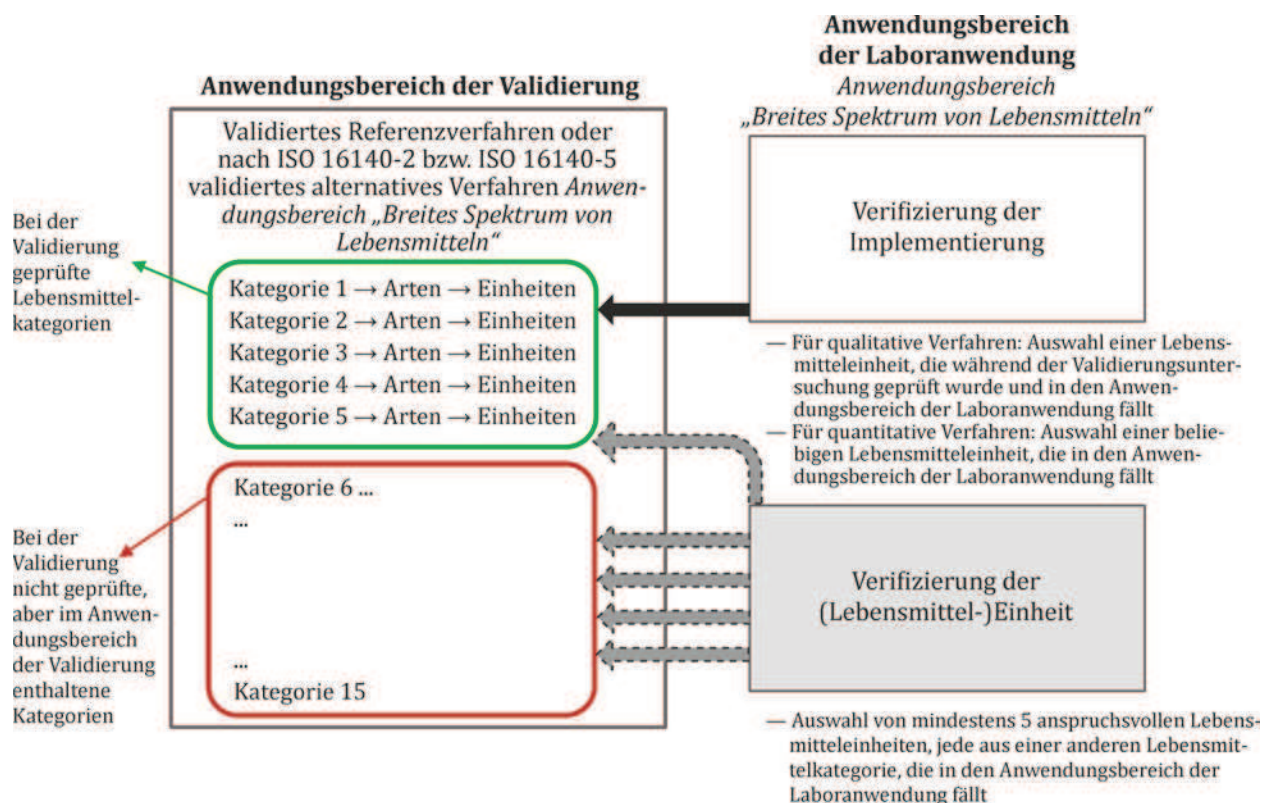


Bild 4 — Lebensmitteleinheiten, die bei der Verifizierung eines Verfahrens für einen Anwendungsbereich „Breites Spektrum von Lebensmitteln“ erforderlich sind

In Bild 4 ist die Auswahl der Kategorien für die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit nur als Beispiel angegeben (Pfeile mit gepunkteten Umrisslinien). Im Gegensatz zur Verifizierung der Implementierung besteht keine Verpflichtung, ein Lebensmittel aus einer bei der Validierung geprüften Kategorie (im Falle qualitativer Verfahren) und vier Lebensmitteleinheiten aus vier bei der Validierung nicht geprüften Lebensmittelkategorien auszuwählen. Das Anwenderlabor kann seine eigene Auswahl aus den 15 Lebensmittelkategorien treffen.

Der in Bild 4 dargestellte Anwendungsbereich der Laboranwendung bezieht sich auf ein „Breites Spektrum von Lebensmitteln“, was bedeutet, dass das Anwenderlabor fünf oder mehr Lebensmittelkategorien in seine Verifizierungsuntersuchung aufgenommen hat und daher die Anwendung für ein „Breites Spektrum von Lebensmitteln“ beanspruchen kann. Ist der Anwendungsbereich der Laboranwendung kleiner als der Anwendungsbereich der Validierung, darf das Anwenderlabor nur Lebensmittel aus seinen eingeschränkten Lebensmittelkategorien prüfen. Falls beispielsweise der Anwendungsbereich der Laboranwendung auf drei Lebensmittelkategorien beschränkt ist, dann muss das Anwenderlabor mindestens ein Lebensmittel aus jeder der drei Lebensmittelkategorien verifizieren.

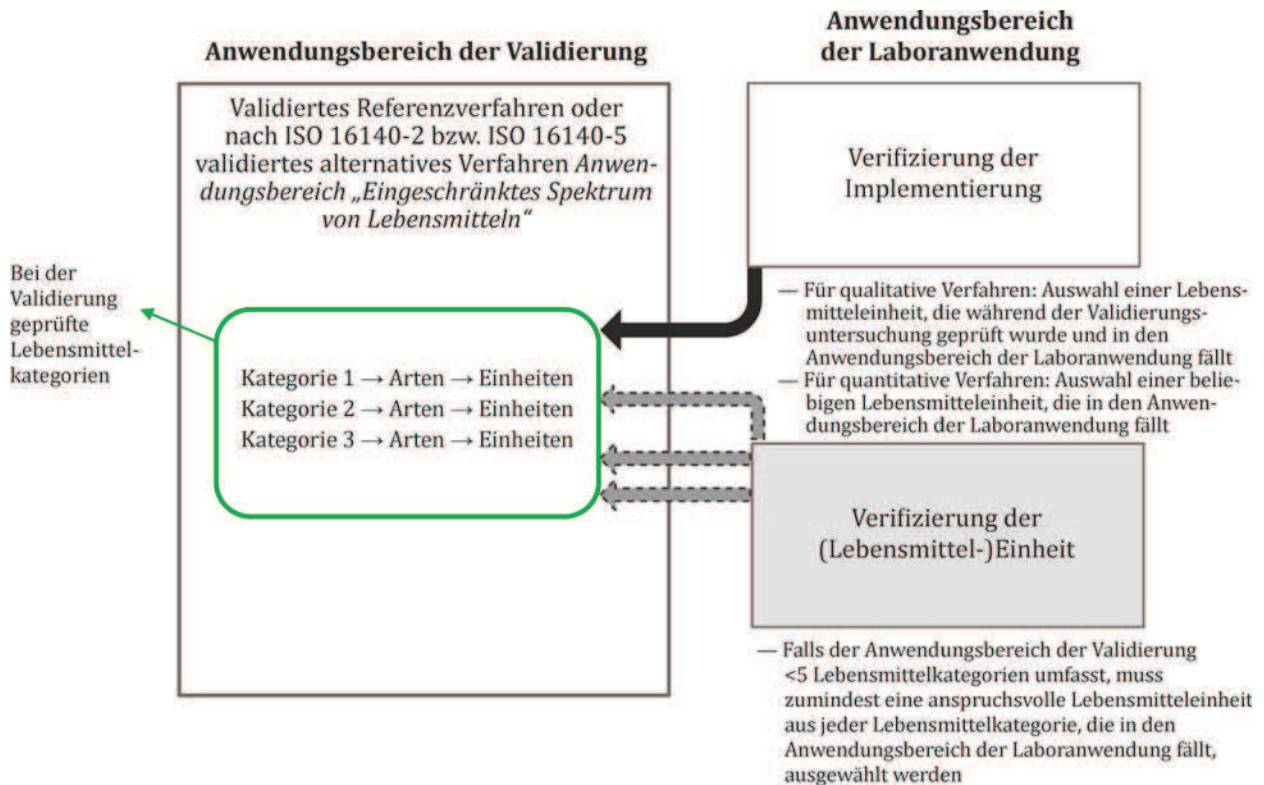


Bild 5 — Lebensmitteleinheiten, die bei der Verifizierung eines Verfahrens für einen Anwendungsbereich „Eingeschränktes Spektrum von Lebensmitteln“ erforderlich sind

In Bild 5 ist die Auswahl der Kategorien für die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit nur als Beispiel angegeben. Für den Anwendungsbereich „Eingeschränktes Spektrum von Lebensmitteln“ wird bei der Validierung eine begrenzte Anzahl von Lebensmittelkategorien geprüft. Das bedeutet, dass der Anwendungsbereich der Validierung auf die geprüften Kategorien beschränkt ist. Folglich darf das Anwenderlabor das Verfahren nicht mit Kategorien außerhalb des begrenzten Anwendungsbereichs verifizieren. Ist der Anwendungsbereich der Laboranwendung kleiner als der Anwendungsbereich der Validierung, darf das Anwenderlabor nur Lebensmitteleinheiten aus seinen eingeschränkten Lebensmittelkategorien prüfen (Pfeile mit gepunkteten Umrisslinien). Wenn der Anwendungsbereich der Validierung auf eine Kategorie beschränkt ist, müssen sowohl die Verifizierung der Implementierung als auch die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit weiterhin durchgeführt werden, wobei mindestens zwei Einheiten aus der Kategorie verwendet werden: eine Einheit für die Verifizierung der Implementierung und eine weitere Lebensmitteleinheit für die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit.

Bild 6 zeigt die Anzahl der Einheiten, die erforderlich sind, wenn Lebensmittel und andere Kategorien validiert und in den Anwendungsbereich der Laboranwendung aufgenommen werden. Diese Kategorien beinhalten Heimtierfutter und Futtermittel, Umgebungsproben (Lebensmittel- oder Futtermittelproduktion) und Proben aus dem Bereich der Primärproduktion (PPS, en: primary production samples). Falls eine dieser anderen Kategorien in die Validierungsuntersuchung aufgenommen wurde und falls beansprucht wird, sie falle in den Anwendungsbereich der Laboranwendung des Anwenderlabors, dann muss auch eine Einheit aus jeder beanspruchten Kategorie in die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit aufgenommen werden.

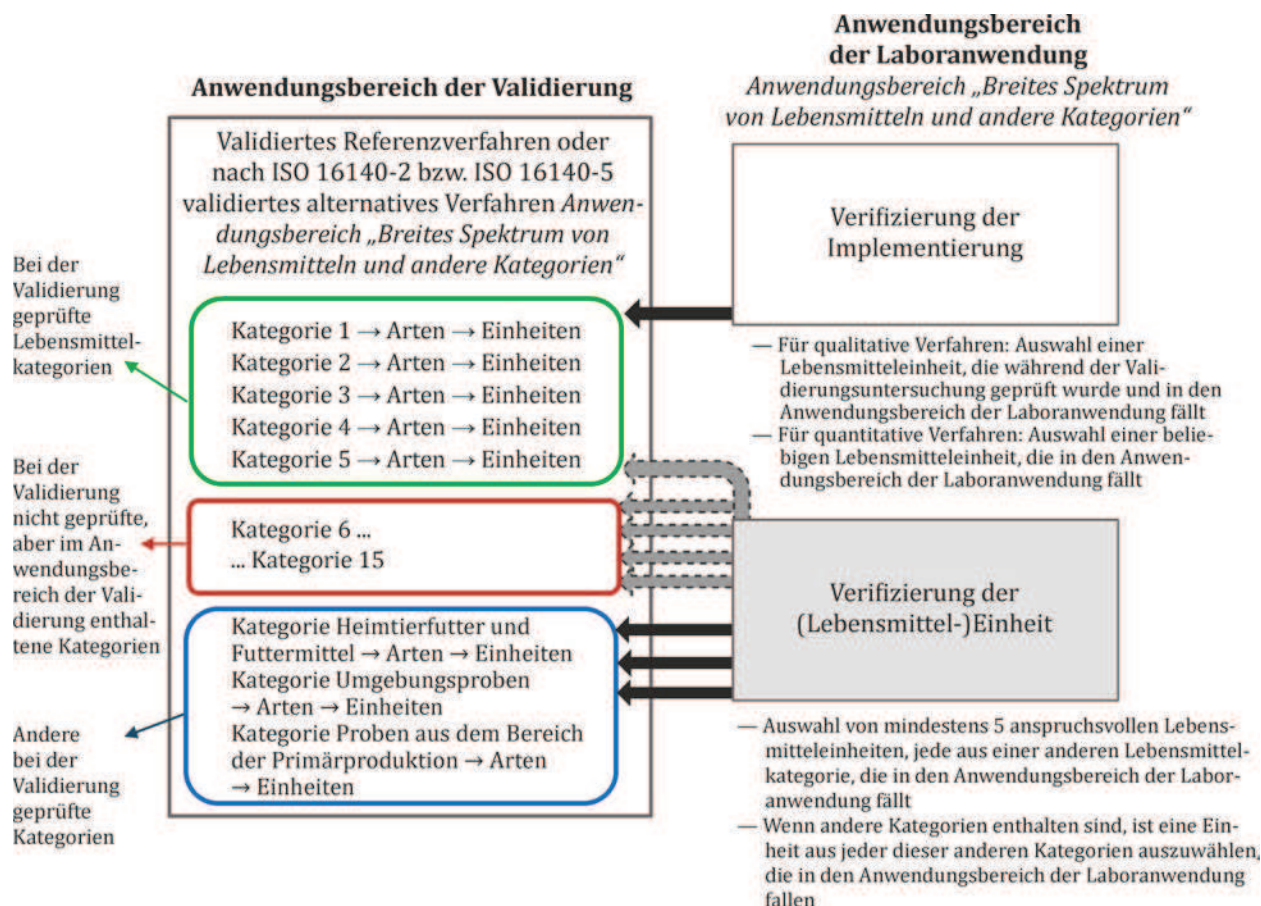


Bild 6 — Einheiten, die bei der Verifizierung eines Verfahrens für den Anwendungsbereich „Breites Spektrum von Lebensmitteln und andere Kategorien“ erforderlich sind

Tabelle 1 fasst die mindestens erforderliche Anzahl von (Lebensmittel-)Einheiten zusammen, die in den unterschiedlichen Szenarien erforderlich sind.

Tabelle 1 — Zusammenfassung der für eine Verifizierung mindestens erforderlichen Anzahl von (Lebensmittel-)Einheiten

Anwendungsbereich der Validierung	Anzahl der Proben		
	Verifizierung der Implementierung	Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit	Gesamt
Anwendungsbereich „Breites Spektrum von Lebensmitteln“ ≥ 5 Lebensmittelkategorien	1	≥ 5	≥ 6
Anwendungsbereich „Eingeschränktes Spektrum von Lebensmitteln“ $N_{\text{Lebensmittel}}$ Kategorien	1	$N_{\text{Lebensmittel}} \leq 4$	$(N_{\text{Lebensmittel}} + 1) \leq 5$
Anwendungsbereich „Breites Spektrum von Lebensmitteln“ + andere Kategorien (N_{Andere})	1	≥ 5 Lebensmitteleinheiten +	$\geq 6 + N_{\text{Andere}}$

Anwendungsbereich der Validierung	Anzahl der Proben		
	Verifizierung der Implementierung	Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit	Gesamt
		1 Einheit aus jeder der N_{Andere} anderen Kategorien	
Anwendungsbereich „Eingeschränktes Spektrum von Lebensmitteln“ $N_{\text{Lebensmittel}}$ Kategorien + andere Kategorien (N_{Andere})	1	$N_{\text{Lebensmittel}} \leq 4$ + 1 Einheit aus jeder der N_{Andere} anderen Kategorien	$(N_{\text{Lebensmittel}} + N_{\text{Andere}} + 1) \leq 8$
Nur Anwendungsbereich andere Kategorien (N_{Andere})	1	$N_{\text{Andere}} \leq 3$	$(N_{\text{Andere}} + 1) \leq 4$

Tabelle A.1 enthält die Liste der (Lebensmittel-)Kategorien und der entsprechenden (Lebensmittel-)Einheiten. Anhang B enthält weitere Anleitungen zur Auswahl einer anspruchsvollen (Lebensmittel-)Einheit aus jeder (Lebensmittel-)Kategorie für die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit. Die aus jeder (Lebensmittel-)Kategorie ausgewählten (Lebensmittel-)Einheiten müssen Einheiten sein, die dem Spektrum der Laborproben entsprechen, die das Anwenderlabor erhalten hat. Soweit wie möglich sollte es sich um Einheiten mit Komponenten wie natürlichen antimikrobiellen Eigenschaften, Vitaminen, Geschmacksstoffen und probiotische Komponenten handeln, die gegebenenfalls die Erkennung der Ziel-Mikroorganismen stören können.

4.5 Leistungsmerkmale

In Tabelle 2 sind die erforderlichen Leistungsmerkmale für die Verifizierung des Verfahrens aufgeführt.

Tabelle 2 — Für die Verifizierung zu bestimmende erforderliche Leistungsmerkmale

Verfahren	Leistungsmerkmal	Verifizierung der Implementierung	Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit
qualitativ	geschätzte Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit ($eLOD_{50}$)	✓	✓
quantitativ	Laborinterne Vergleichstandardabweichung (S_{IR})	✓	nicht anwendbar
	geschätzte systematische Abweichung (eBias)	nicht anwendbar	✓
<p>ANMERKUNG 1 Die Beziehung zwischen laborinterner Vergleichstandardabweichung (S_{IR}) und ISO 19036 wird in 6.1 erläutert.</p> <p>ANMERKUNG 2 Für die Verifizierung des qualitativen Verfahrens werden dem Anwenderlabor drei Arbeitsvorschriften vorgeschlagen. Die Arbeitsvorschrift 3 verlangt nicht die Bestimmung einer geschätzten Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit ($eLOD_{50}$), sondern das Erreichen einer Konzentration von 3 KBE bis 5 KBE/Prüfmenge.</p>			

5 Qualitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung

5.1 Bestimmung der geschätzten Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit (eLOD₅₀)

Die Bestimmung der geschätzten Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit (eLOD₅₀) wird sowohl für die Verifizierung der Implementierung als auch für die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit benötigt.

- Das Anwenderlabor befolgt zunächst eine der ausgewählten technischen Arbeitsvorschriften, welche unten vollständig ausgeführt sind, um die Verifizierung der Implementierung vollständig durchzuführen und damit seine Befähigung darzustellen, das validierte Verfahren fehlerfrei durchführen zu können.
- Anschließend wendet das Anwenderlabor diese technische Arbeitsvorschrift auf die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit an.

Während der Verifizierung des Verfahrens wird der gesamte Ablauf des Verfahrens wie beschrieben befolgt. Hierzu zählt ggf. auch die Bestätigungsprüfung. Es muss mindestens eine einzelne Prüfmenge in jedem Beimpfungsniveau bestätigt werden und die Anzahl der Kolonien zur Bestätigung darf auf eine reduziert werden.

5.2 Untersuchungsdesign

Das Anwenderlabor muss eine der drei in Tabelle 3 beschriebenen Arbeitsvorschriften auswählen.

Tabelle 3 — Arbeitsvorschriften zur Bestimmung der eLOD₅₀ und Anzahl der benötigten Parallelproben je Beimpfungsniveau

Arbeitsvorschrift	Beimpfungsniveau der Prüfmenge					
	Hohes Niveau 9 × LOD ₅₀ / Prüfmenge	Mittleres Niveau 3 × LOD ₅₀ / Prüfmenge	Niedriges Niveau 1 × LOD ₅₀ / Prüfmenge	3 KBE bis 5 KBE/ Prüfmenge	Negativkontrolle	Gesamtanzahl von Parallelproben
1	1	4	4	–	1	10
2	–	3	5	–	1	9
3	–	–	–	7	1	8
ANMERKUNG KBE ist die Abkürzung für „koloniebildende Einheiten“ (en: colony forming units, cfu).						

Die Wahl der Arbeitsvorschrift hängt von der Fähigkeit des Labors ab, das gewünschte Kontaminationsniveau der Prüfmenge zu erreichen. Zur Beimpfung können im Labor gezüchtete Kulturen oder Referenzmaterialien verwendet werden (siehe 5.4.1).

- Die Arbeitsvorschrift 1 kann verwendet werden, wenn Unsicherheit über das Erreichen des gewünschten Kontaminationsniveaus der Prüfmenge besteht. Dies ist von Bedeutung, wenn eine Kultur ohne vorherige Kenntnis des tatsächlichen Niveaus des Inokulums verwendet wird, um die Prüfmengen zu beimpfen.
- Die Arbeitsvorschrift 3 kann verwendet werden, wenn das Kontaminationsniveau des Inokulums bekannt ist, z. B. bei Verwendung eines Referenzmaterials mit bekannter Konzentration.

- Die Arbeitsvorschrift 2 kann verwendet werden, wenn die erste gewählte Arbeitsvorschrift nicht wie erwartet funktioniert hat und die Untersuchung wiederholt werden muss.

Zusätzliche Verdünnungen zu den für eine der Arbeitsvorschriften vorgeschriebenen können verwendet werden, um die Notwendigkeit einer Wiederholung der Untersuchung zu minimieren, wenn die Beimpfungsniveaus nicht den Anforderungen entsprechen oder die Ergebnisse der Verifizierungsprüfung nicht interpretiert werden können (siehe Tabelle 6 und Tabelle 8). Dies ist jedoch nicht zwingend erforderlich, sondern die Entscheidung des Labors, das die Untersuchung durchführt.

Die Arbeitsvorschriften müssen wie folgt durchgeführt werden.

- Herstellung von Kulturen der Ziel-Mikroorganismen zur Beimpfung der (Lebensmittel-)Einheiten.
- Herstellung von mindestens der Anzahl von Prüfmengen derselben (Lebensmittel-)Einheit wie für die gewählte Arbeitsvorschrift erforderlich sind (siehe Tabelle 3). Auswahl einer (Lebensmittel-)Einheit, die nicht auf natürlichem Weg mit dem Ziel-Mikroorganismus kontaminiert sein sollte.
- Beimpfung der Erstverdünnungen der Prüfmengen nach der ausgewählten Arbeitsvorschrift in Tabelle 3.
- Bestimmung des Niveaus des Ziel-Mikroorganismus im Inokulum gleichzeitig mit der Beimpfung der Prüfmengen durch Aufbringen auf ein nicht-selektives Medium (z. B. Agar-Zählplatten) oder durch Bestimmung der wahrscheinlichsten Keimzahl (MPN, en: Most Probable Number) (z. B. 3 Verdünnungen $\times$ 3 Röhrchen). Auszählung nach ISO 7218.

ANMERKUNG Falls das Beimpfungsniveau der Kulturen nicht bekannt ist, können weitere Prüfmengen mit zusätzlichen Verdünnungen beimpft werden, damit sichergestellt ist, dass die Zielniveaus in der Verifizierung enthalten sind.

- Analyse der beimpften Prüfmengen mithilfe des vollständigen Ablaufes des zu verifizierenden Verfahrens.
- Für Arbeitsvorschrift 1 und Arbeitsvorschrift 2: Bestimmung der $eLOD_{50}$ unter Verwendung der erhaltenen positiven und negativen Ergebnisse (siehe 5.5 für Einzelheiten). Für Arbeitsvorschrift 3 wird keine $eLOD_{50}$ bestimmt. Stattdessen werden die Ergebnisse auf der Grundlage der Anzahl der unter den sieben geprüften Parallelproben gefundenen positiven Ergebnisse ausgewertet.

Siehe auch Anhang C zu weiteren Anleitungen und Beispielen.

5.3 Auswahl von (Lebensmittel-)Einheiten

Für die Verifizierung der Implementierung wird eine (Lebensmittel-)Einheit benötigt. Jede (Lebensmittel-)Einheit, die in die Validierung einbezogen ist und in den Anwendungsbereich der Laboranwendung fällt, kann ausgewählt werden.

Bei der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit muss das Anwenderlabor mindestens eine (Lebensmittel-)Einheit, bevorzugt eine anspruchsvolle, aus jeder der geforderten (Lebensmittel-)Kategorien prüfen. Einzelheiten über die erforderliche Anzahl der zu prüfenden (Lebensmittel-)Kategorien nach dem Anwendungsbereich der Validierung oder dem Anwendungsbereich der Laboranwendung sind in 4.4 beschrieben. Anhang B enthält Anleitungen zur Auswahl von anspruchsvollen (Lebensmittel-)Einheiten.

5.4 Künstliche Kontamination

5.4.1 Auswahl von Stämmen

Stämme können aus

- Kultursammlungen,
- Sammlungen des Anwenderlabors,
- Referenzmaterialien (einschließlich handelsüblichen Referenzmaterialien, z. B. ein gefriergetrockneter Stamm mit bekannter Konzentration) stammen.

Bei der Auswahl der Prüfstämme sollte die Mehrheit aus den für die Verifizierungsuntersuchung ausgewählten (Lebensmittel-)Kategorien stammen und das anerkannte Spektrum des Zielanalyten hinsichtlich der Vielfalt der Identifizierungsmerkmale (z. B. biochemische, Serovar, Phagentyp), der geographischen Verbreitung und der Inzidenz abdecken (siehe ISO 16140-2:2016, Anhang E).

ANMERKUNG Die bei der Verifizierung verwendeten Stämme entstammen vorzugsweise aus Quellen, die mit der zu verifizierenden (Lebensmittel-)Einheit im Zusammenhang stehen und bevorzugt wird für jede der zu prüfenden (Lebensmittel-)Einheiten ein anderer Stamm verwendet.

5.4.2 Beimpfung der Prüfmengen

Es werden die LOD_{50} -Daten der entsprechenden (Lebensmittel-)Kategorien aus der Validierungsuntersuchung des Verfahrens zur Bestimmung des Kontaminationsniveaus (dieses sollte zwischen der ein- bis neunfachen LOD_{50} liegen, siehe Tabelle 3), das für die Beimpfung der Prüfmenge verwendet wird, verwendet. Für Arbeitsvorschrift 3 werden 3 KBE bis 5 KBE/Prüfmenge verwendet.

Falls in der Validierungsuntersuchung keine entsprechenden (Lebensmittel-)Kategorien verfügbar sind [z. B. für eine anspruchsvolle (Lebensmittel-)Einheit, die in der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit geprüft wurde], wird angenommen, dass der LOD_{50} -Wert gleich oder niedriger als 1 KBE/Prüfmenge ist.

Als Beispiel für geeignete Verfahren zur Herstellung von Inokula wird die folgende Anleitung aufgeführt.

- Der ausgewählte Stamm wird in einem Nährmedium unter Bedingungen angezüchtet, die ein optimales Wachstum des Stamms ermöglichen (z. B. in einer Übernachtskultur). Dabei werden die Verfahren aus ISO 11133:2014, 5.4, beachtet.

ANMERKUNG In diesem Dokument wird die Übernachtskultur mit 16 h bis 24 h Bebrütung angegeben.

- Die Kultur wird auf einem nicht-selektiven Medium ausgezählt, um die Konzentration des Stamms in KBE/ml zu bestimmen. Dabei wird davon ausgegangen, dass dieses Niveau immer wieder erreicht werden kann, wenn die gleichen Kulturbedingungen verwendet werden.
- Es werden mehrere Kulturen unter den gleichen Bedingungen hergestellt. Dabei wird die zuvor bestimmte Konzentration berücksichtigt, damit Verdünnungen hergestellt werden, die das Spektrum der Beimpfung abdecken. Dieser Schritt ist nicht erforderlich, wenn die Stabilität des Stamms im Anwenderlabor bekannt ist (z. B. Lebensfähigkeit nach der Lagerung über Nacht bei 4 °C).

Falls das Anwenderlabor mit gebrauchsfertigen Zielstämmen mit bekannten Kontaminationsniveaus arbeitet (z. B. mit Referenzmaterial), sind die oben genannten Schritte nicht erforderlich.

Das hergestellte Inokulum wird direkt in die Erstverdünnung der einzelnen Prüfmengen eingebracht. Nach der Beimpfung wird die Suspension gründlich durchmischt. Die Verwendung belasteter („gestresster“) Kulturen wird empfohlen, ist aber nicht zwingend erforderlich (siehe ISO 16140-2:2016, Anhang C).

Tabelle 4 enthält einen Leitfaden, wie die Beimpfungsniveaus für die einzelnen Arbeitsvorschriften erreicht werden können.

Tabelle 4 — Beimpfungsniveaus für jede Arbeitsvorschrift

Arbeitsvorschrift	Hohes Niveau $9 \times \text{LOD}_{50}$ /Prüfmenge	Mittleres Niveau $3 \times \text{LOD}_{50}$ /Prüfmenge	Niedriges Niveau $1 \times \text{LOD}_{50}$ /Prüfmenge	3 KBE bis 5 KBE/Prüfmenge
1	Dieses sollte maximal das Neunfache der erwarteten LOD_{50} betragen.	Aus dem hohen Beimpfungsniveau wird eine 1 : 3-Verdünnung hergestellt, um das mittlere Beimpfungsniveau zu erhalten.	Aus dem mittleren Beimpfungsniveau wird eine 1 : 3-Verdünnung hergestellt, um das niedrige Beimpfungsniveau zu erhalten.	–
2	–	Dieses sollte maximal das Dreifache der erwarteten LOD_{50} betragen.	Aus dem mittleren Beimpfungsniveau wird eine 1 : 3-Verdünnung hergestellt, um das niedrige Beimpfungsniveau zu erhalten.	–
3	–	–	–	Das Kontaminationsniveau des Inokulums ist bekannt, (z. B. bei Verwendung eines Referenzmaterials mit bekannter Konzentration).

Es können mehr Verdünnungen geprüft werden, um sicherzustellen, dass die Zielniveaus enthalten sind. Es werden so viele Verdünnungen wie nötig verwendet, aber es wird immer ein Verdünnungsfaktor von 1 : 3 zwischen den einzelnen Niveaus berücksichtigt.

Zur Bestimmung des Beimpfungsniveaus wird zum Zeitpunkt der Beimpfung der Prüfmengen das Inokulum mit hohem Beimpfungsniveau bei Verwendung von Arbeitsvorschrift 1, das Inokulum mit mittlerem Beimpfungsniveau bei Verwendung von Arbeitsvorschrift 2 oder das Inokulum mit 3 KBE bis 5 KBE/Prüfmenge bei Verwendung von Arbeitsvorschrift 3 nach ISO 7218 (unter Verwendung eines nicht-selektiven Mediums, z. B. Agar-Zählplatten) ausgezählt. Es wird berücksichtigt, dass das Kontaminationsniveau des Inokulums sehr niedrig ist und daher mehr Parallelproben und/oder ein größeres Volumen des Inokulums analysiert werden müssen, um ein gültiges Ergebnis nach ISO 7218 zu erhalten. Die Konzentration des mittleren und niedrigen Beimpfungsniveaus bei Verwendung von Arbeitsvorschrift 1 oder 2 werden auf der Grundlage der erhaltenen Zählung und der verwendeten Verdünnungsfaktoren berechnet.

Alternativ kann eine MPN-Bestimmung der Inokula mit einem MPN-Ansatz von 3 Verdünnungen $\times$ 3 Röhrchen durchgeführt werden; die Verwendung eines nicht-selektiven Mediums zur Anreicherung (z. B.