

DIN EN ISO 16140-3

ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2018-03-05

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Verfahrensvalidierung –
Teil 3: Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz- und
alternativen Verfahren in einem einzelnen Labor (ISO/DIS 16140-3:2017);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 16140-3:2017**

Microbiology of the food chain –

Method validation –

Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods
implemented in a single laboratory (ISO/DIS 16140-3:2017);

German and English version prEN ISO 16140-3:2017

Microbiologie de la chaîne alimentaire –

Validation des méthodes –

Partie 3: Protocole pour la vérification de méthodes de référence et alternatives validées
appliquées dans un laboratoire (ISO/DIS 16140-3:2017);

Version allemande et anglaise prEN ISO 16140-3:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-01-05 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-
Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de,
sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im
Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-
Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL),
10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 124 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)



Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 16140-3:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik – Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

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

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

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

ISO 6887	siehe DIN EN ISO 6887
ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
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 17468:2016	siehe DIN EN ISO 17468:2016-11
ISO/CD 19036	siehe DIN ISO/TS 19036, DIN SPEC 10125
ISO 21528-1	siehe DIN EN ISO 21528-1
ISO 21528-2	siehe DIN EN ISO 21528-2

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 6887 (alle Teile), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — 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 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 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 ISO/TS 19036, DIN SPEC 10125, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Anleitung zur Feststellung von Messunsicherheiten bei quantitativen Bestimmungen (ISO/TS 19036:2006 + Amd.1:2009)*

DIN EN ISO 21528-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von Enterobacteriaceae — Teil 1: Nachweis von Enterobacteriaceae (ISO 21528-1)*

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

— Leerseite —

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 3:
Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz- und alternativen
Verfahren in einem einzelnen Labor (ISO/DIS 16140-3:2017)**

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes — Partie 3 : Protocole pour la vérification de méthodes de référence et alternatives validées appliquées dans un laboratoire (ISO/DIS 16140-3:2017)

Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory (ISO/DIS 16140-3:2017)

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.9b

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Vorwort	6
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	9
2 Normative Verweisungen	9
3 Begriffe	9
4 Kurzbeschreibung	12
4.1 Allgemeines	12
4.2 Verifizierung der Implementierung	12
4.3 Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit	13
4.4 Durchführung der Verifizierung und der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit	13
4.5 Leistungsmerkmale	17
5 Qualitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung	17
5.1 Bestimmung der geschätzten systematischen Abweichung mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit (eLOD ₅₀)	17
5.2 Versuchsaufbau	18
5.3 Auswahl von (Lebensmittel-)Einheiten	18
5.4 Künstliche Kontamination	18
5.4.1 Auswahl von Stämmen	18
5.4.2 Beimpfung der Prüfmengen	19
5.5 Ergebnisse	20
5.6 Annahmekriterien	22
5.7 Ursachenanalyse	23
6 Quantitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung	23
6.1 Bestimmung der Präzision (der laborinternen Vergleichpräzision)	23
6.1.1 Allgemeines	23
6.1.2 Versuchsaufbau	24
6.1.3 Auswahl von (Lebensmittel-)Einheiten	26
6.1.4 Natürliche Kontamination	26
6.1.5 Künstliche Kontamination	26
6.1.6 Ergebnisse	28
6.1.7 Annahmekriterien	28
6.1.8 Ursachenanalyse	31
6.2 Geschätzte systematische Abweichung	31
6.2.1 Allgemeines	31
6.2.2 Prüfaufbau	31
6.2.3 Auswahl von (Lebensmittel-)Einheiten	32
6.2.4 Künstliche Kontamination	32
6.2.5 Ergebnisse	33
6.2.6 Annahmekriterien	34
6.2.7 Ursachenanalyse	35
7 Zusammenfassung der Annahmekriterien	35

Anhang A (informativ) Einteilung von (Lebensmittel-)Kategorien und vorgeschlagene beabsichtigte Kombinationen für Verifizierungsuntersuchungen	36
Anhang B (normativ) Anforderungen und Anleitungen zur Auswahl anspruchsvoller (Lebensmittel-)Einheiten für die Verifizierung von (Lebensmittel-) Einheiten	57
B.1 Allgemeines	57
B.2 Zu bedenkende Matrixeffekte.....	57
B.2.1 Mikrobielle Charakteristiken	57
B.2.2 Physikalische und chemische Eigenschaften	58
B.2.3 Eigenschaften von Lebensmittel-herstellenden Prozessen.....	58
B.3 Auswahl von (Lebensmittel-)Einheiten zur Verifizierung	58
Anhang C (informativ) Arbeitsvorschrift für die Verifizierung des QUALITATIVEN Verfahrens	60
Anhang D (informativ) Arbeitsvorschrift für die Verifizierung des QUANTITATIVEN Verfahrens	63
D.1 Arbeitsvorschrift für die Bestimmung der Präzision (der laborinternen Vergleichpräzision)	63
D.2 Arbeitsvorschrift für die Bestimmung der geschätzten systematischen Abweichung (eBias).....	64
Literaturhinweise.....	68

Bilder

Bild 1 — Flussdiagramm zur Anwendung der verschiedenen Teile der Normenreihe ISO 16140	8
Bild 2 — (Lebensmittel-)Einheiten, die für die Verifizierung eines Referenzverfahrens ohne veröffentlichte Validierungsdaten beim Anwendungsbereich „Eingeschränktes Spektrum von Lebensmitteln“ erforderlich sind.....	16
Bild 3 — Arbeitsvorschrift für den Versuch zur Schätzung der Standardabweichung der (laborinternen) Vergleichpräzision (S_{IR})	25
Bild C.1 — Beispiel für eine vorläufige Bestimmung des Beimpfungsniveaus	60
Bild C2 — Beispiel für die Herstellung des Inokulums.....	61
Bild C.4 — Beispiel für die Beimpfung der Prüfmengen	61
Bild C.4 — Beispiel für die Auszählung des tatsächlichen Beimpfungsniveaus	62
Bild D.1 — Herstellung von Proben zur Bestimmung der Präzision	63
Bild D.2 — Vorschläge für Abweichungen bei der Bestimmung der Präzision	64
Bild D.3 — Beispiel für eine vorläufige Bestimmung des Beimpfungsniveaus.....	65
Bild D.4 — Beispiel für die Herstellung des Inokulums	65
Bild D.5 — Beispiel für die Beimpfung der Prüfmengen.....	66
Bild D.6 — Beispiel für eine Verifizierung des quantitativen Verfahrens mithilfe künstlicher Kontamination	67

Tabellen

Tabelle 1 — Durchführung der Verifizierung und der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit.....	13
Tabelle 2 — Zusammenfassung der für eine Verifizierung mindestens erforderlichen Anzahlen an (Lebensmittel-)Einheiten	16
Tabelle 3 — Für die Verifizierung zu bestimmende erforderliche Leistungsmerkmale	17
Tabelle 4 — Schätzung der $eLOD_{50}$ auf der Grundlage der Anzahl positiver Ergebnisse bei jedem Kontaminationsniveau	21
Tabelle 5 — Berechnungsbeispiel der $eLOD_{50}$ bei Verwendung eines bekannten Beimpfungsniveaus.....	22

Tabelle 6 — Prüfergebnisse.....	29
Tabelle 7 — Berechnung von S_{IR}	30
Tabelle 8 — Zusammenfassung der S_R -Werte aus der Validierungsuntersuchung für ISO 21528-2.....	30
Tabelle 9 — Prüfergebnisse.....	34
Tabelle 10 — Annahmekriterien bei der Verifizierung	35
Tabelle A.1 — Einteilung von Proben und deren Bedeutung für die Untersuchung auf verschiedene Mikroorganismen	37
Tabelle B.1 — Beispiel von (Lebensmittel-)Einheiten und ihrer Eigenschaften.....	58
Tabelle B.2 — Beispiele für Eigenschaften von (Lebensmittel-)Einheiten, die die Leistung der unterschiedlichen Verfahrensprinzipien beeinflussen können.....	59

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 16140-3:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 16140-3:2017 wurde von CEN als prEN ISO 16140-3:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

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

Eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen, sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology* (Arbeitsgruppe WG 3 *Method validation*), erarbeitet.

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

Einleitung

Die Normenreihe ISO 16140 wurde ausgearbeitet, um auf die Anforderung zu reagieren, verschiedene Möglichkeiten zur Validierung oder Verifizierung von Prüfverfahren bereitzustellen. Sie folgt auf die Normenreihe ISO 16140:2003, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods*. Die Normenreihe ISO 16140 besteht aus mehreren 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 and validated alternative methods implemented in a single laboratory*
- *Part 4: Protocol for single-laboratory (in-house) method validation*
- *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, *Microbiology of the food chain — Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method* [2], ist eine Internationale Norm, die mit dieser Normenreihe eng verbunden ist. Diese Internationale Norm, die technische Regeln für die Entwicklung und Validierung von genormten Verfahren vorschreibt, dient den Technischen Komitees ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, und CEN/TC 275/WG 6, *Microbiology of the food chain*, als Grundlage für die Entwicklung von genormten Verfahren.

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

- Die erste Stufe umfasst die Validierung des Verfahrens. Diese wird entweder in mehreren Laboren (Teile 2 und 5 von ISO 16140) oder in einem Labor (Teil 4 von ISO 16140) durchgeführt.
- Die zweite Stufe besteht aus der Verifizierung des Verfahrens. Hier wird von einem Labor gezeigt, dass es das Validierungsverfahren zufriedenstellend durchführen kann. Der Vorgang der Verfahrensverifizierung wird in Teil 3 von ISO 16140 beschrieben. In diesem Teil 3 wird unterschieden zwischen der Verifizierung von in der Validierungsstudie enthaltenen (Lebensmittel-)Einheiten und in der Validierungsstudie nicht untersuchten aber im Anwendungsbereich der Validierung enthaltenen (Lebensmittel-)Einheiten.

ANMERKUNG 1 Bei genormten Referenzverfahren (mit und ohne veröffentlichte Validierungsdaten) ist vor der Umsetzung im Labor lediglich eine Verifizierung erforderlich.

ANMERKUNG 2 Zur Verbesserung der Lesbarkeit dieses Dokuments werden in diesem Teil der ISO 16140 die Begriffe „Kategorie“, „Art“ und „Einheit“ bisweilen mit dem Begriff „Lebensmittel“ kombiniert. Allerdings kann der Begriff „Lebensmittel“ nach den Angaben im Anwendungsbereich von ISO 16140-3 hierbei durch den Begriff „Futtermittel“ und die Begriffe aus anderen Bereichen der Lebensmittelkette ausgetauscht werden.

Teil 4 von ISO 16140 befasst sich mit der Validierung in einem Labor. Die Ergebnisse gelten daher nur für das Labor, in dem die Untersuchung durchgeführt wurde. In diesem Fall ist eine Verifizierung (nach Teil 3 von ISO 16140) nicht erforderlich.

Teil 5 von ISO 16140 beschreibt die Arbeitsvorschriften für die Fälle, in denen eine schnellere Validierung erforderlich ist, oder in denen es um die Validierung hoch spezialisierter Verfahren geht und die Anzahl der nach ISO 16140-2 erforderlichen Laboratorien nicht erreicht werden kann.

Das Flussdiagramm in Bild 1 gibt einen Überblick über die Verknüpfungen zwischen den unterschiedlichen oben genannten Teilen. Darüber hinaus enthält er Anweisungen für Anwender zur Auswahl des richtigen Teils der Normenreihe ISO 16140. Dabei werden auch der Zweck der Untersuchung und die oben angegebenen Anmerkungen berücksichtigt. Hierzu muss auf jeden Fall zwischen den Begriffen „Referenzverfahren“ und „genormtes Referenzverfahren“ unterschieden werden. Bei einem Referenzverfahren handelt es sich um ein international anerkanntes und in hohem Maße akzeptiertes Verfahren (Begriff 2.59 aus ISO 16140-1:2016). Dagegen ist ein genormtes Referenzverfahren ein Verfahren, das in einer Norm (Begriff 3.5 aus ISO 17468:2016) beschrieben wird. In der Normenreihe ISO 16140 umfasst der Begriff „Referenzverfahren“ auch die genormten Referenzverfahren. Im Flussdiagramm wird dargestellt, dass es für einige genormte Referenzverfahren unter Umständen keine veröffentlichten Validierungsdaten gibt.

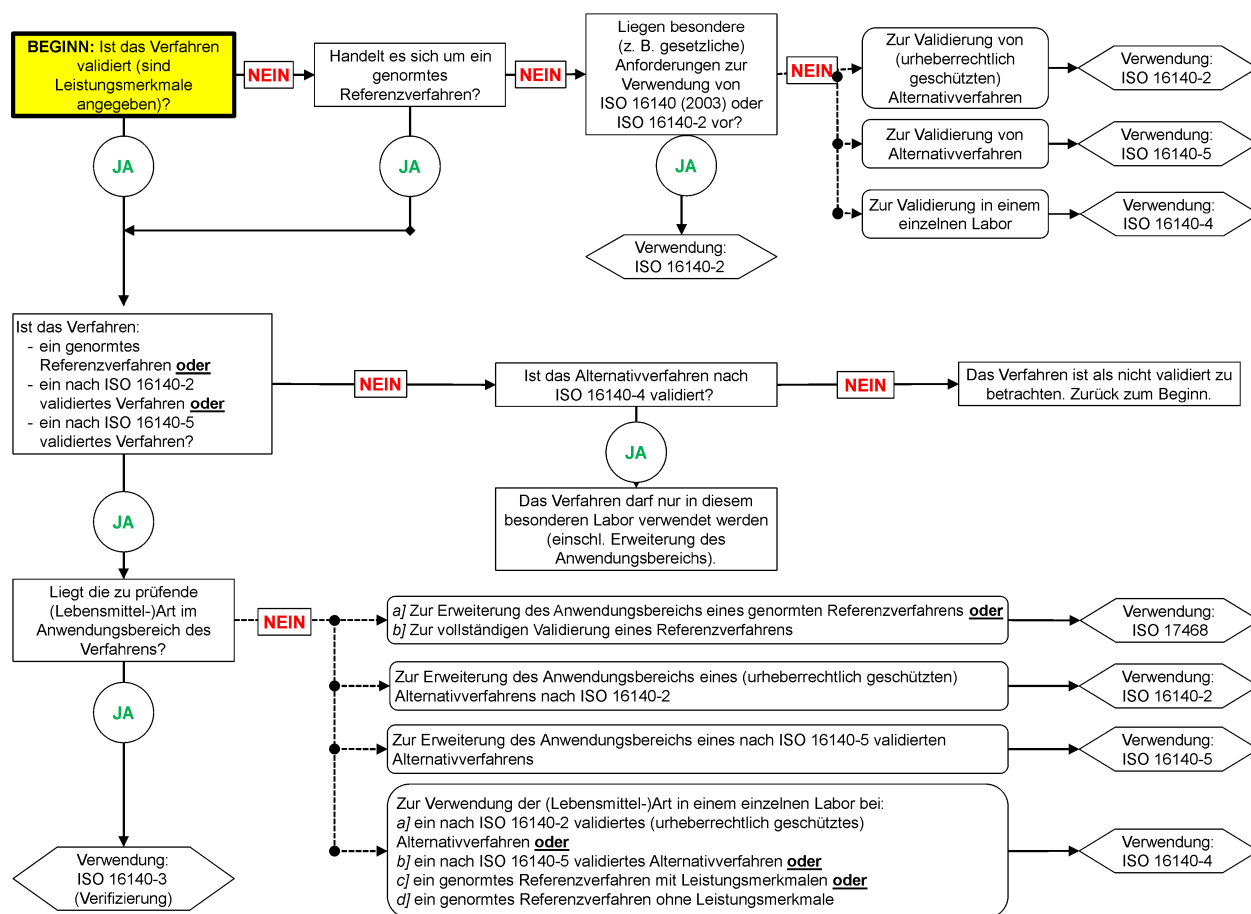


Bild 1 — Flussdiagramm zur Anwendung der verschiedenen Teile der Normenreihe ISO 16140

Teil 6 von ISO 16140 unterscheidet sich insofern ein wenig von den anderen Teilen dieser Normenreihe, als er sich auf eine sehr spezifische Situation bezieht, bei der lediglich die Bestätigungsprüfung des Verfahrens validiert wird. Bei der Bestätigungsprüfung wird ein angenommenes (mutmaßliches) Ergebnis in ein bestätigtes definitives Ergebnis umgesetzt. Die Typisierung reiner Stämme (z. B. bei der Serotypisierung von *Salmonellen*) ist ebenfalls in Teil 6 von ISO 16140 enthalten.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 16140 beschreibt die Arbeitsvorschriften, die bei der Verifizierung der Referenzverfahren, der genormten Referenzverfahren und der validierten Alternativverfahren zur Umsetzung im Anwenderlabor eingesetzt werden. Die Verfahrensverifizierung gilt nicht für unvalidierte Alternativverfahren.

Dieser Teil von ISO 16140 ist anwendbar auf die Verifizierung von Verfahren zur Untersuchung (Nachweis bzw. quantitative Bestimmung) 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.

Dieser Teil von ISO 16140 gilt insbesondere für Bakterien und Pilze. Einige Abschnitte sind auf andere (Mikro-)Organismen oder deren Metaboliten anwendbar. Die Bestimmung muss im Einzelfall erfolgen.

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

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

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*

ISO 16140-2:2016, *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe und Definitionen nach ISO 16140-1 sowie die Folgenden. ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

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

3.1
systematische Abweichung
systematische Abweichung bei Messungen
Schätzwert eines systematischen Messfehlers oder systematische Differenz zwischen dem quantitativen zugewiesenen Wert und dem Mittelwert der Ergebnisse von Wiederholungsmessungen

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

3.2
Kategorie
Gruppe von (Lebensmittel-)Arten gemeinsamer Herkunft

BEISPIEL Wärmebehandelte Milch und Molkereiprodukte.

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

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.11, modifiziert]

3.3
geschätzte systematische Abweichung
eBias
Bestimmung der systematischen Abweichung auf der Grundlage des in diesem Dokument beschriebenen Prüfaufbaus

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 [von en: „estimated bias“]) verwendet.

3.4
geschätzte Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit
eLOD₅₀
Bestimmung der LOD₅₀ (Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit) auf der Grundlage des in diesem Dokument beschriebenen Prüfaufbaus

Anmerkung 1 zum Begriff: Eine genaue Bestimmung der geschätzten Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit (LOD₅₀, en: „level of detection“) ist nicht möglich, da die Anzahl der untersuchten Proben zu klein ist. Aus diesem Grund wird der Begriff „geschätzte Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit“ (eLOD₅₀) verwendet.

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

3.5
Beweismittel
einzelnes festgelegtes Lebensmittel oder Futtermittel bzw. einzelne festgelegte Umgebungsprobe oder Matrix aus der Primärproduktion

BEISPIEL Lebensmittelkategorie: wärmebehandelte Milch und Molkereiprodukte; Lebensmittelart: pasteurisiertes Molkereiprodukt; Lebensmitteleinheit: Dessertcreme.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.34]

3.6
Laborprobe
zur Versendung in ein Labor vorbereitete Probe, die untersucht bzw. geprüft werden soll

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

3.7

Matrix

Produkt

alle Komponenten der Probe

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.38]

3.8

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 können Kalibrierung eines Messsystems, Beurteilung eines Messverfahrens, Zuweisung von Werten zu anderen Materialien und Qualitätskontrollen sein.

[QUELLE: ISO Guide 30:2015, 2.1.1, modifiziert]

3.9

Anwendungsbereich im Labor

Analyte, Matrices und Konzentrationen für analytische Verfahren, die von einem Anwenderlabor als für die zufriedenstellende Prüfung des Labors ausreichend dargestellt werden

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.

3.10

Anwendungsbereich der Validierung

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

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.70]

3.11

Prüfmenge

aus einer Laborprobe entnommene und (nach Volumen oder Masse) gemessene repräsentative Probe, aus der die Erstverdünnung hergestellt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Manchmal ist vor der Entnahme der Prüfmenge die Herstellung einer Untersuchungsprobe aus einer Laborprobe erforderlich. Aber dies geschieht bei mikrobiologischen Untersuchungen nicht häufig.

[QUELLE: ISO 6887-1:2017, 3.5, modifiziert]

3.12

Untersuchungsprobe

aus einer Laborprobe nach den Angaben im Prüfverfahren hergestellte Probe, von der die Prüfmengen entnommen werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Herstellung einer Untersuchungsprobe aus einer Laborprobe vor der Entnahme der Prüfmenge geschieht bei mikrobiologischen Untersuchungen nicht häufig.

[QUELLE: ISO 6887-1:2017, 3.4, modifiziert]

3.13

Art

Gruppe von (Lebensmittel-)Einheiten für eine gegebene Kategorie, die auf ähnliche Weise verarbeitet wurden, ähnliche intrinsische Merkmale aufweisen und einer ähnlichen mikrobiellen Ökologie entstammen

BEISPIEL Lebensmittelkategorie: wärmebehandelte Milch und Molkereiprodukte; Lebensmittelart: pasteurisiertes Molkereiprodukt.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.78, modifiziert]

3.14

Anwenderlabor

Labor, in dem ein validiertes Alternativverfahren bzw. ein Referenzverfahren umgesetzt wird

3.15

Verifizierung

Nachweis, dass ein validiertes Verfahren bei der Anwendung durch den Anwender nach den in der Validierungsuntersuchung bestimmten Verfahrensspezifikationen funktioniert und gebrauchstauglich ist

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeines

Bevor eine Verfahrensverifizierung durchgeführt wird, muss auf jeden Fall auf die veröffentlichten Validierungsdaten des Verfahrens verwiesen werden, um den Anwendungsbereich der Validierung zu bestätigen und die geeigneten (Lebensmittel-)Einheiten auszuwählen.

Die Verifizierung findet in zwei Schritten statt:

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

Anwenderlabore, die beabsichtigen Verfahren zu verifizieren, für die bereits Validierungsdaten zum Vergleich vorliegen (hierzu zählen alle validierten Alternativverfahren), müssen sowohl die Umsetzung als auch die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit durchführen. Bei einigen Referenzverfahren liegen unter Umständen *keine* veröffentlichten Validierungsdaten vor. Bei diesen Verfahren führen die Anwenderlabore lediglich eine Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit durch.

Noch nicht validierte Alternativverfahren müssen zunächst validiert werden, bevor ein Anwenderlabor die Verwendung im Labor verifizieren kann (siehe Bild 1).

4.2 Verifizierung der Implementierung

Die Verifizierung der Implementierung dient dazu, die Kompetenz des Anwenderlabors zur Durchführung des Validierungsverfahrens darzustellen. Dabei werden die Ergebnisse des Anwenderlabors mit denen aus der Validierung verglichen. Die Verifizierung der Implementierung ist nur auf die folgenden Verfahren mit vorhandenen veröffentlichten Validierungsdaten anwendbar:

- Referenzverfahren; sowie
- validierte Alternativverfahren.

Das Anwenderlabor muss folgende Schritte ausführen:

- Prüfung der bereits veröffentlichten Validierungsdaten für das betreffende Verfahren;
- Auswahl einer (Lebensmittel-)Einheit, die während der Validierungsuntersuchung geprüft wurde und nach Möglichkeit in den Anwendungsbereich des Anwenderlabors fällt; sowie
- Nutzung dieser (Lebensmittel-)Einheit und der während der Validierungsuntersuchung verwendeten Probengrößen bei der Durchführung der Verifizierung der Implementierung.

4.3 Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit

Die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit ist auf Referenzverfahren mit und ohne bereits veröffentlichte Validierungsdaten sowie auf validierte Alternativverfahren mit Validierungsdaten anwendbar. Ziel der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit ist die Darstellung, dass das Anwenderlabor für die Durchführung des validierten Verfahrens mit im Labor geprüften (Lebensmittel-)Einheiten kompetent ist.

4.4 Durchführung der Verifizierung und der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit

Tabelle 1 enthält Anleitungen, wann eine Verifizierung der Implementierung und wann eine Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit verwendet werden soll.

Tabelle 1 — Durchführung der Verifizierung und der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit

	Verfahren mit veröffentlichten Validierungsdaten		Verfahren ohne veröffentlichte Validierungsdaten	
	Referenzverfahren	Alternativverfahren	Referenzverfahren	Alternativverfahren
Verifizierung der Implementierung	ja	ja	nicht anwendbar	nicht anwendbar ^a
Verifizierung der (Lebensmittel-) Einheit	ja	ja	ja	nicht anwendbar ^a
^a Nicht anwendbar: Das Verfahren muss zunächst nach ISO 16140-2 oder ISO 16140-5 validiert werden, sodass anschließend Validierungsdaten zur Verfügung stehen (siehe Bild 1).				

Bild 2a bis Bild 2d zeigen die Anzahl der (Lebensmittel-)Einheiten, die unter unterschiedlichen Bedingungen für die Verifizierung der Implementierung und die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheiten erforderlich sind.

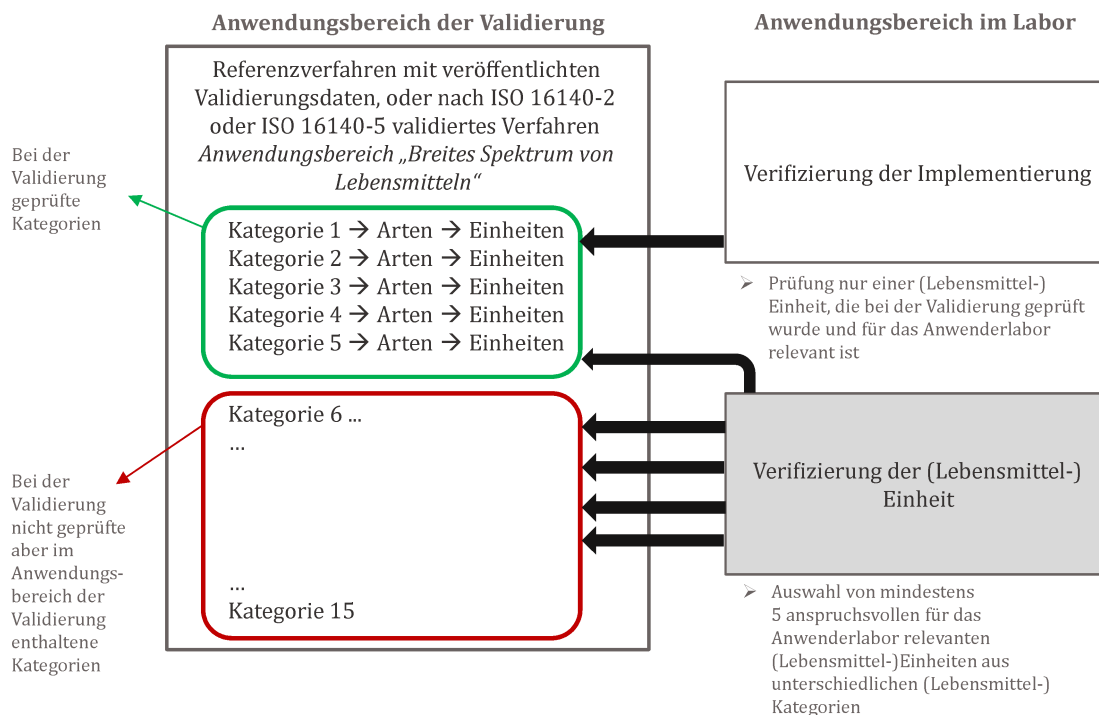


Bild 2a — (Lebensmittel-)Einheiten, die für die Verifizierung eines Referenzverfahrens mit veröffentlichten Validierungsdaten oder eines validierten Alternativverfahrens beim Anwendungsbereich „Breites Spektrum von Lebensmitteln“ erforderlich sind

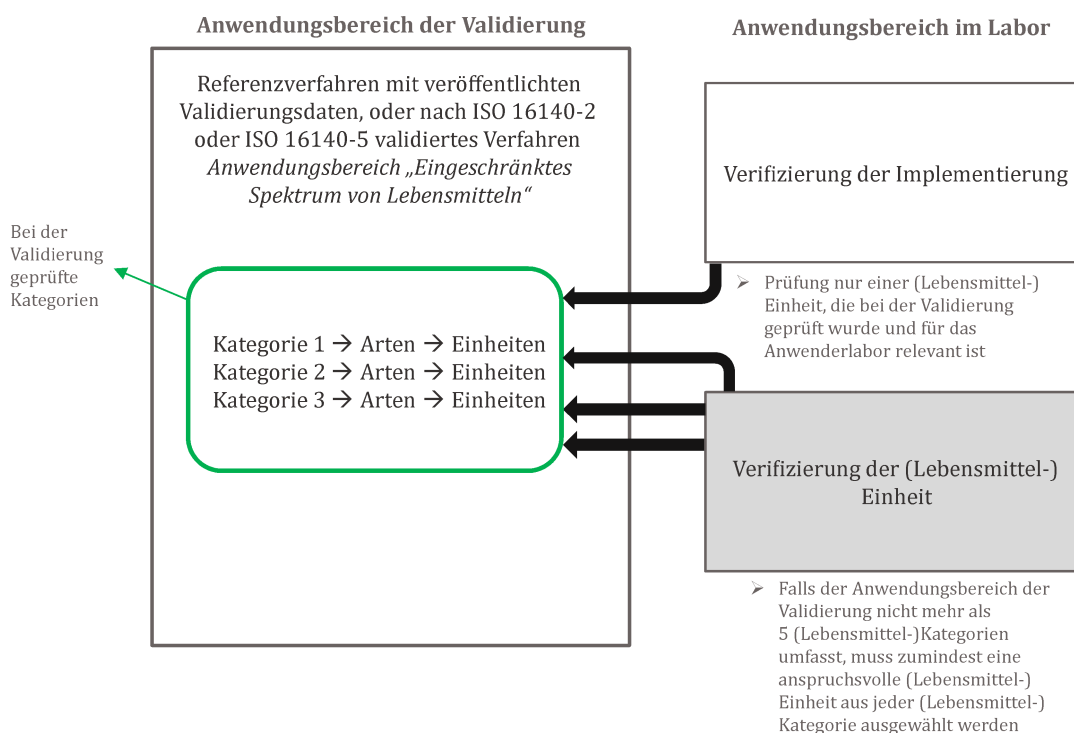


Bild 2b — (Lebensmittel-)Einheiten, die für die Verifizierung eines Referenzverfahrens mit veröffentlichten Validierungsdaten oder eines validierten Alternativverfahrens beim Anwendungsbereich „Eingeschränktes Spektrum von Lebensmitteln“ erforderlich sind

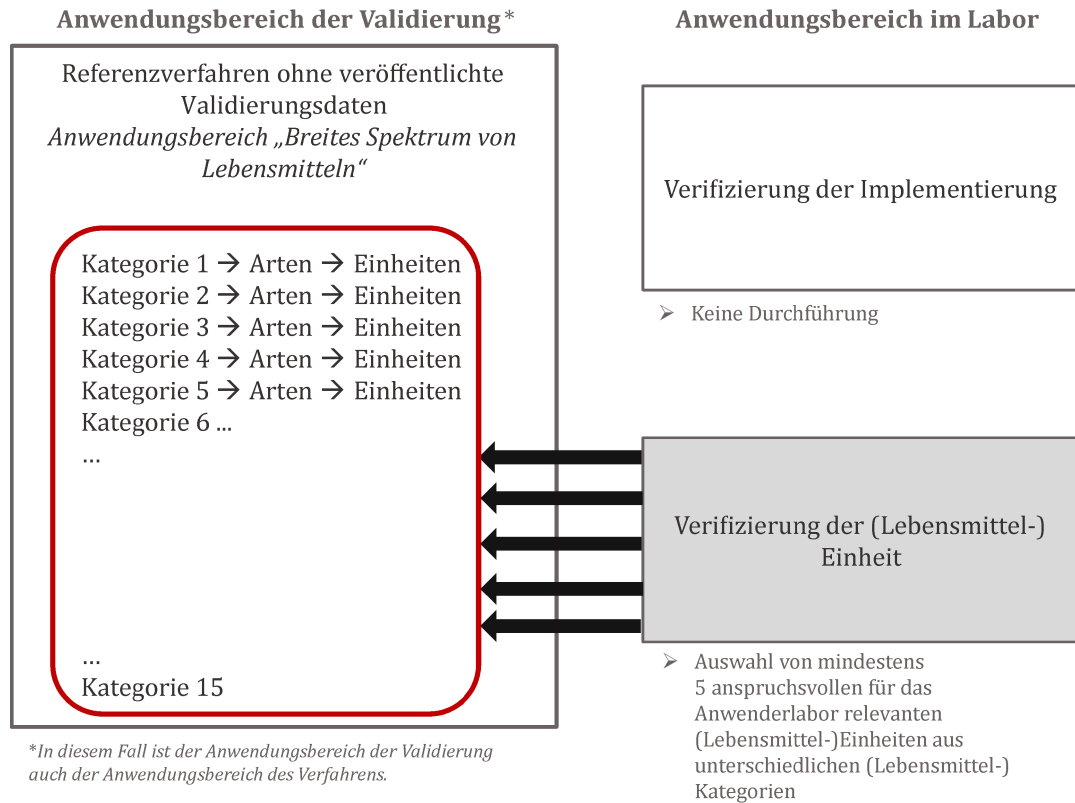


Bild 2c — (Lebensmittel-)Einheiten, die für die Verifizierung eines Referenzverfahrens ohne veröffentlichte Validierungsdaten beim Anwendungsbereich „Breites Spektrum von Lebensmitteln“ erforderlich sind

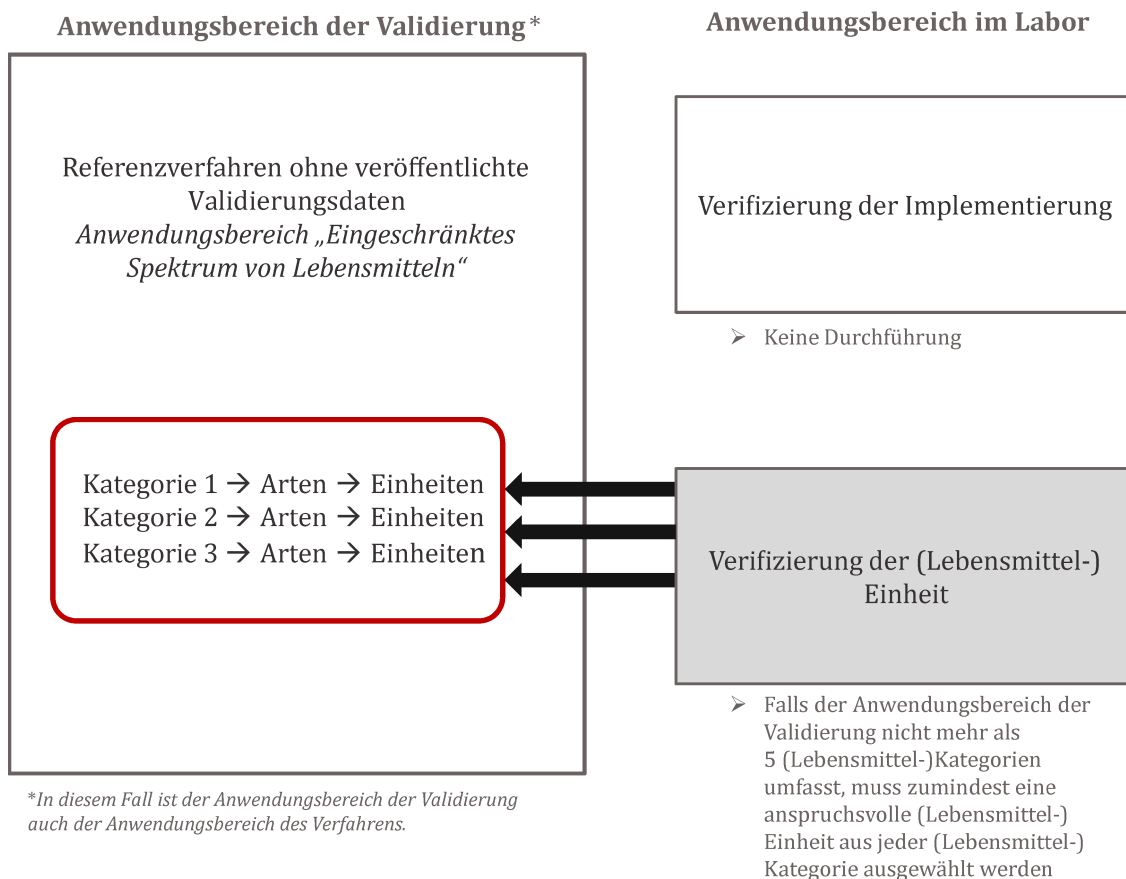


Bild 2d — (Lebensmittel-)Einheiten, die für die Verifizierung eines Referenzverfahrens ohne veröffentlichte Validierungsdaten beim Anwendungsbereich „Eingeschränktes Spektrum von Lebensmitteln“ erforderlich sind

Tabelle 2 fasst die mindestens erforderlichen Anzahlen an (Lebensmittel-)Einheiten zusammen, die in den unterschiedlichen Szenarien erforderlich sind.

Tabelle 2 — Zusammenfassung der für eine Verifizierung mindestens erforderlichen Anzahlen an (Lebensmittel-)Einheiten

Anwendungsbereich der Validierung	Veröffentlichte Validierungsdaten?	Anzahl der Proben		
		Verifizierung der Implementierung	Verifizierung der (Lebensmittel-) Einheit	Mindestanzahl gesamt
Zahlreiche Lebensmittel (≥ 5 Kategorien)	ja	1	≥ 5	6
	nein ^a	0	≥ 5	5
Wenige Lebensmittel (N Kategorien)	ja	1	N	N + 1
	nein ^a	0	N	N

^a Nicht bei validierten Alternativverfahren anwendbar, da diese stets Validierungsdaten aufweisen.

Tabelle A.1 aus Anhang A enthält eine Liste der (Lebensmittel-)Kategorien und der entsprechenden (Lebensmittel-)Einheiten. Anhang B können Anforderungen und weitere Anleitungen zur Auswahl anspruchsvoller (Lebensmittel-)Einheiten aus jeder (Lebensmittel-)Kategorie für die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit entnommen werden. Die aus jeder (Lebensmittel-)Kategorie ausgewählten (Lebensmittel-)Einheiten müssen Einheiten sein, die den Laborproben entsprechen, die das Anwenderlabor erhalten hat. Soweit wie möglich sollte es sich um Einheiten mit Komponenten wie natürlichen antimikrobiellen Eigenschaften, Vitamine, Geschmacksstoffe und probiotische Komponenten usw. handeln, die in Anhang B beschrieben werden und gegebenenfalls die Erkennung der Ziel-Mikroorganismen stören.

Falls Heimtierfutter und Futtermittel, Umweltproben und Proben aus der Primärproduktion als zusätzliche (nicht auf Lebensmittel bezogene) Kategorien in die Validierungsuntersuchung aufgenommen wurden und das Anwenderlabor den Anspruch erhebt, auch für diese Kategorien kompetent zu sein, so muss von jeder der betreffenden Kategorien eine Einheit in die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit einbezogen werden.

4.5 Leistungsmerkmale

Tabelle 3 beschreibt die erforderlichen Leistungsmerkmale für die Verfahrensverifikation.

Tabelle 3 — Für die Verifizierung zu bestimmende erforderliche Leistungsmerkmale

Verfahren	Leistungsmerkmale	Verifizierung der Implementierung	Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit
qualitativ	geschätzte Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit ($eLOD_{50}$)	ja	ja
quantitativ	Laborinterne Vergleichpräzision (S_{IR})	ja	
	geschätzte systematische Abweichung ($eBias$)		ja
ANMERKUNG Im Hinblick auf die laborinterne Vergleichpräzision (S_{IR}) wird die Beziehung zu ISO/CD 19036 in 6.1 eingehender erläutert.			

5 Qualitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung

5.1 Bestimmung der geschätzten systematischen Abweichung mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit ($eLOD_{50}$)

Die Bestimmung der geschätzten systematischen Abweichung mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit ($eLOD_{50}$) wird sowohl für die Implementierung als auch für die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheiten benötigt.

- Das Anwenderlabor folgt zunächst der unten umrissenen gesamten technischen Arbeitsvorschrift, um die Verifizierung der Implementierung vollständig durchzuführen und damit seine Befähigung darzustellen, das validierte Verfahren durchführen zu können.
- Anschließend wendet das Anwenderlabor diese technische Arbeitsvorschrift auf die Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit an.

Während der Verifizierung des Verfahrens wird die technische Arbeitsvorschrift wie beschrieben befolgt. Hierzu zählt ggf. auch die Bestätigungsprüfung. Auch wenn die Anzahl der Kolonien zur Bestätigung auf eins reduziert werden kann, muss doch jede einzelne Prüfmenge bestätigt werden.

5.2 Versuchsaufbau

Die technische Arbeitsvorschrift muss wie folgt umgesetzt werden (siehe auch Anhang C zu weiteren Anleitungen und Beispielen):

- Herstellung von Kulturen der Ziel-Mikroorganismen zur Beimpfung der (Lebensmittel-)Einheiten.
- Herstellung von mindestens 8 Prüfmengen aus einer (Lebensmittel-)Einheit. Auswahl einer (Lebensmittel-)Einheit, die nicht auf natürlichem Weg mit dem Ziel-Mikroorganismus kontaminiert sein sollte.
- Beimpfung von 6 Prüfmengen: 2 mit hohem Niveau, 2 mit mittlerem Niveau und 2 mit niedrigem Niveau beimpft. Die restlichen 2 Prüfmengen verbleiben unbeimpft. Auswahl einer (Lebensmittel-)Einheit, die nachweislich nicht auf natürlichem Weg mit dem Ziel-Mikroorganismus kontaminiert wurde. Dies sind die „leeren“ Prüfmengen, die ein negatives Ergebnis erbringen müssen.

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

- Gleichzeitig mit der Beimpfung der Prüfmengen erfolgt die Bestimmung des Kontaminationsniveaus durch Plattierung der Beimpfung mit hohem Niveau nach ISO 7218. Hierzu wird ein nicht selektives Medium verwendet (z. B. Agar-Zählplatten). Die Kontaminationsniveaus der anderen beimpften Prüfmengen werden auf der Grundlage der Zählung der Hochniveau-Beimpfung berechnet. Dabei müssen die verwendeten Verdünnungsfaktoren berücksichtigt werden.
- Die Prüfmengen müssen nach der vollständigen technischen Arbeitsvorschrift für das zu verifizierende Verfahren geprüft werden.
- Die $eLOD_{50}$ wird anhand der positiven und der negativen Ergebnisse berechnet (siehe 5.5).

5.3 Auswahl von (Lebensmittel-)Einheiten

Bei der Verifizierung der Implementierung wird nur eine (Lebensmittel-)Einheit benötigt. Die ausgewählte (Lebensmittel-)Einheit muss in der Validierungsuntersuchung enthalten und vorzugsweise im Anwenderlabor geprüft worden sein.

Bei der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit muss das Anwenderlabor zumindest eine, im besten Fall anspruchsvolle, (Lebensmittel-)Einheit prüfen. Diese muss aus den (Lebensmittel-)Kategorien stammen, die im Anwendungsbereich der Laboranwendung enthalten ist (siehe 4.4). Anhang B enthält Anleitungen zur Auswahl von anspruchsvollen (Lebensmittel-)Einheiten.

5.4 Künstliche Kontamination

5.4.1 Auswahl von Stämmen

Die bei der Verifizierung verwendeten (Bakterien-)Stämme sind vorzugsweise von Quellen zu entnehmen, die mit der zu verifizierenden (Lebensmittel-)Einheit im Zusammenhang stehen.

Mögliche Quellen können folgende sein:

- Kultursammlungen;
- Sammlungen des Anwenderlabors;
- Referenzmaterial (einschließlich handelsübliches Referenzmaterial, z. B. gefriergetrocknetes Material mit bekannter Konzentration).

Die Auswahl und Charakterisierung der Stämme muss sich nach den in ISO 7218 angegebenen Anforderungen richten. Vorzugsweise ist für jede einzelne zu prüfende (Lebensmittel-)Einheit ein anderer Stamm zu verwenden.

5.4.2 Beimpfung der Prüfmengen

Anhand der LOD_{50} -Daten aus der Validierungsuntersuchung des Verfahrens wird der Kontaminationsbereich (zwischen dem ein- bis zehnfachen der LOD_{50}) bestimmt, mit dem die betreffende Prüfmenge beimpft wird. Falls die LOD_{50} nicht bekannt ist (z. B. bei Referenzverfahren ohne veröffentlichte Validierungsdaten), wird ein Wert angenommen, der höchstens 1 cfu/Prüfmenge entspricht.

Als Beispiel für geeignete Verfahren zur Herstellung von Inokula wird die folgende Anleitung aufgeführt. Der ausgewählte Stamm wird in einem Nährmedium unter Bedingungen gezogen, die ein optimales Wachstum des Stamms ermöglichen (z. B. in einer Übernachtskultur). Dabei sind die Verfahren aus ISO 11133 zu beachten.

Die Kultur wird auf einem nicht selektiven Medium ausgezählt, um die Konzentration des Stamms zu bestimmen. Dabei wird davon ausgegangen, dass dieses Konzentrationsniveau konsistent erreicht werden kann, wenn die gleichen Kulturbedingungen verwendet werden.

Es werden mehrere Kulturen unter den gleichen Bedingungen hergestellt. Dabei ist die zuvor bestimmte Konzentration zu berücksichtigen, damit Verdünnungen hergestellt werden können, die den beabsichtigten Kontaminationsbereich abdecken. Dieser Schritt ist nicht erforderlich, wenn die Wachstumsbedingungen des Stamms im Anwenderlabor allgemein bekannt sind (z. B. Stabilität 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 muss die Verdünnung gut durchgemischt werden, damit eine gleichmäßige Verdünnung des Inokulums sichergestellt ist. Die Verwendung belasteter Kulturen wird empfohlen, ist aber nicht zwingend erforderlich.

Für jede (Lebensmittel-)Einheit müssen mindestens drei Inokula mit unterschiedlichem Beimpfungsniveau verwendet werden.

Die drei Beimpfungsniveaus sind:

- Hohes Beimpfungsniveau: sollte maximal die zehnfache erwartete LOD_{50} sein. Wenn die LOD_{50} nicht bekannt ist, wird empfohlen, ein Beimpfungsniveau von 10 cfu/Prüfmenge zu verwenden.
- Mittleres Beimpfungsniveau: Aus dem hohen Beimpfungsniveau wird eine 1:2-Verdünnung hergestellt, um das mittlere Beimpfungsniveau zu erhalten. Das Beimpfungsniveau bei unbekannter LOD_{50} sollte bei 5 cfu/Prüfmenge liegen.
- Niedriges Beimpfungsniveau: Aus dem hohen Beimpfungsniveau wird eine 1:10-Verdünnung hergestellt, um das niedrige Beimpfungsniveau zu erhalten. Das Beimpfungsniveau bei unbekannter LOD_{50} sollte bei 1 cfu/Prüfmenge liegen.

ANMERKUNG cfu ist die Abkürzung für „colony forming units“ (Koloniebildende Einheiten, KbE).

Zur Feststellung des Beimpfungsniveaus (dieser Schritt erfolgt gleichzeitig mit der Beimpfung der Prüfmengen) wird die Beimpfung mit hohem Niveau nach ISO 7218 ausgezählt. Hierzu wird ein nicht selektives Medium verwendet (z. B. Agar-Zählplatten). Das mittlere und das niedrige Beimpfungsniveau werden auf der Grundlage der Zählung der Beimpfung mit hohem Niveau berechnet. Dabei müssen die verwendeten Verdünnungsfaktoren berücksichtigt werden.

BEISPIEL Ein Anwenderlabor möchte ein *Salmonellen*-Verfahren verifizieren.

- Auf der Grundlage der in der Validierungsuntersuchung festgestellten LOD_{50} (2,5 cfu/Prüfmenge) liegt der Kontaminationsbereich von (Lebensmittel-)Einheit A theoretisch bei 25 cfu/Prüfmenge, 12,5 cfu/Prüfmenge und 2,5 cfu/Prüfmenge.
- Zur Bestimmung des Kontaminationsbereichs wird eine Übernachtskultur hergestellt, bei der aufgrund der vorläufigen Auszählung von einer Kontamination von 5×10^8 cfu/ml ausgegangen wird.
- Da die tatsächliche Auszählung der neuen Übernachtskultur unbekannt ist, kann das Anwenderlabor mehrere Verdünnungen verwenden, um die drei beabsichtigten Kontaminationen abzudecken. Dabei wird jede Verdünnung bei zwei Prüfmengen verwendet. In diesem Fall gilt:
 - 1 ml und 0,5 ml der 10^{-7} -Verdünnung (zur Abdeckung unvorhergesehen niedriger Konzentrationen);
 - 1 ml und 0,5 ml der 10^{-7} -Verdünnung, im Verhältnis 1:2 verdünnt;
 - 1 ml und 0,5 ml der 10^{-8} -Verdünnung (zur Abdeckung unvorhergesehen hoher Konzentrationen).
- Insgesamt werden 12 inokulierte Prüfmengen und 2 „leere“ Prüfmengen untersucht. Für die Berechnung werden aber nur die drei relevanten Stufen und die „leeren“ Prüfmengen aufbewahrt.
- Bei diesem Beispiel ergeben die Auszählungen der duplizierten Platten von einer der Verdünnungen für die Auszählung des Inokulums die Werte 14 und 22. Daraus ergibt sich für das endgültige durchschnittliche Kontaminationsniveau bei dieser Verdünnung ein Wert von 18 cfu/ml.
- Mit dieser ausgewählten Verdünnung bei einem hohen Beimpfungsniveau (1 ml der 10^{-7} -Verdünnung) liegt das mittlere Beimpfungsniveau (1:2-Verdünnung des hohen Beimpfungsniveaus) mutmaßlich bei 9 cfu/Prüfmenge und das niedrige Beimpfungsniveau (1 ml der 10^{-8} -Verdünnung) bei 1,8 cfu/Prüfmenge. Siehe hierzu auch Anhang C.

5.5 Ergebnisse

Die Anzahl der positiven Ergebnisse aus jedem Beimpfungsniveau wird aufgezeichnet. Anhand von Tabelle 4 wird dann die $eLOD_{50}$ bestimmt.

Die „leeren“ Beimpfungsniveaus dürfen nicht zu positiven Ergebnissen führen. Werden doch positive Ergebnisse erhalten, sind die Versuche für alle Konzentrationen zu wiederholen.

Das hochkonzentrierte Inokulum ($10 \times LOD_{50}$) darf nur positive Ergebnisse haben. Werden doch negative Ergebnisse erhalten, sind die Versuche für alle Konzentrationen zu wiederholen.

Tabelle 4 — Schätzung der $eLOD_{50}$ auf der Grundlage der Anzahl positiver Ergebnisse bei jedem Kontaminationsniveau

Hohes Beimpfungsniveau (Ziel: $10 \times LOD_{50}$ /Prüfmenge)	Mittleres Beimpfungsniveau (Ziel: $5 \times LOD_{50}$ /Prüfmenge)	Niedriges Beimpfungsniveau (Ziel: $1 \times LOD_{50}$ /Prüfmenge)	„Leeres“ Niveau	$eLOD_{50}$ (cfu/Prüfmenge)
2/2	2/2	2/2	0/2	$< 1 \times nBG^a$
2/2	2/2	$\frac{1}{2}$	0/2	$= 1 \times nBG$
2/2	2/2	0/2	0/2	$= 2 \times nBG$
2/2	1/2	2/2	0/2	$= 2 \times nBG$
2/2	1/2	$\frac{1}{2}$	0/2	$= 3 \times nBG$
2/2	1/2	0/2	0/2	$= 4 \times nBG$
2/2	0/2	2/2	0/2	unzuverlässiges Ergebnis ^b
2/2	0/2	$\frac{1}{2}$	0/2	$= 5 \times nBG$
2/2	0/2	0/2	0/2	$= 8 \times nBG$
ANMERKUNG Der MPN-Rechner kann unter der folgenden Adresse gefunden werden: http://standards.iso.org/iso/7218 .				
^a nBN = niedriges Beimpfungsniveau. ^b Diese Kombination von Ergebnissen ist bei den geprüften Kontaminationsniveaus sehr unwahrscheinlich und führt mit dem MPN-Rechner zu einem unzuverlässigen Ergebnis. Die Prüfung muss daher wiederholt werden.				

Auf der Grundlage des nach den Angaben in 5.4.2 bestimmten tatsächlichen Beimpfungsniveaus kann Tabelle 4 geändert werden: siehe Tabelle 5. Bei diesem Beispiel wurde eine hohe Kontamination von 18 cfu/Prüfmenge mit der entsprechenden mittleren Kontamination von 9 cfu/Prüfmenge und der niedrigen Kontamination von 1,8 cfu/Prüfmenge verwendet.

Tabelle 5 — Berechnungsbeispiel der $eLOD_{50}$ bei Verwendung eines bekannten Beimpfungsniveaus

Hohes Beimpfungsniveau (= 18 cfu/ Prüfmenge)	Mittleres Beimpfungsniveau (= 9 cfu/Prüfmenge)	Niedriges Beimpfungsniveau (= 1,8 cfu/Prüfmenge)	„Leeres“ Niveau	$eLOD_{50}$ (cfu/Prüfmenge)
2/2	2/2	2/2	0/2	< 1,8
2/2	2/2	1/2	0/2	1,8
2/2	2/2	0/2	0/2	3,6 (2 × 1,8)
2/2	1/2	2/2	0/2	3,6 (2 × 1,8)
2/2	1/2	1/2	0/2	5,4 (3 × 1,8)
2/2	1/2	0/2	0/2	7,2 (4 × 1,8)
2/2	0/2	2/2	0/2	unzuverlässiges Ergebnis ^a
2/2	0/2	1/2	0/2	9,0 (5 × 1,8)
2/2	0/2	0/2	0/2	14,4 (8 × 1,8)

^a Diese Kombination von Ergebnissen ist bei den geprüften Kontaminationsniveaus sehr unwahrscheinlich und führt mit dem MPN-Rechner zu einem unzuverlässigen Ergebnis. Die Prüfung muss daher wiederholt werden.

5.6 Annahmekriterien

Die nach Tabelle 4 bestimmte $eLOD_{50}$ muss mit der LOD_{50} aus der Validierungsuntersuchung verglichen werden. Die $eLOD_{50}$ darf nicht $> 3 \times LOD_{50}$ aus der Validierungsuntersuchung sein. Falls die LOD_{50} aus den Daten der Validierungsuntersuchung nicht hervorgeht (z. B. bei Referenzverfahren ohne veröffentlichte Validierungsdaten), so darf die $eLOD_{50}$ höchstens 3 cfu/Prüfmenge betragen. Der Wert von 3 cfu/Prüfmenge ergibt sich aus einem annehmbaren theoretischen Wert für die LOD_{50} von 1 cfu/Prüfmenge (zuzüglich einer Grenze des dreifach darüberliegenden Werts).

ANMERKUNG Die Annahmekriterien werden in Abschnitt 7 zusammengefasst.

BEISPIEL

- Die in der Validierungsuntersuchung beobachtete LOD_{50} kann als cfu/ml oder als cfu/Prüfmenge ausgedrückt werden. Die LOD_{50} der Validierung muss als cfu/Prüfmenge ausgedrückt werden, damit das Ergebnis mit dem der Verifizierungsuntersuchung verglichen werden kann.
- Falls die in der Validierungsuntersuchung beobachtete LOD_{50} als cfu/g oder als cfu/ml angegeben wurde, muss die LOD_{50} mit der Größe der verwendeten Prüfmenge multipliziert werden. Daher ergibt eine LOD_{50} von 0,1 cfu/g oder von 0,1 cfu/ml eine LOD_{50} von 2,5, sofern eine Prüfmenge von 25 g verwendet wird.
- Falls die LOD_{50} der Validierungsuntersuchung beispielsweise 2,5 cfu/Prüfmenge beträgt, so liegt der maximal zulässige Wert der $eLOD_{50}$ bei 7,5 cfu/Prüfmenge (maximal das Dreifache der LOD_{50}).
- Auf der Grundlage des Beispiels aus 5.4.2 sind die drei letzten Kombinationen in Tabelle 5 nicht zulässig, da die $eLOD_{50}$ entweder unzuverlässig oder zu hoch ist ($eLOD_{50}$ von 9,0 cfu/Prüfmenge oder von 14,4 cfu/Prüfmenge).

5.7 Ursachenanalyse

Wenn die Ergebnisse den Annahmekriterien nicht entsprechen (wenn also die $eLOD_{50} > 3 \times LOD_{50}$ aus der Validierungsuntersuchung ist), wird eine Ursachenanalyse durchgeführt, um eine Erklärung für die beobachteten Ergebnisse zu erhalten.

Diese Ursachenanalyse könnte wie folgt durchgeführt werden:

- Feststellung von Fehlern, die auf menschliche Faktoren zurückzuführen sind;
- Feststellung von Fehlern, die auf verwendete Geräte zurückzuführen sind;
- Feststellung von Fehlern, die auf Mangel an guter Laborpraxis zurückzuführen sind;
- Feststellung von Analysefehlern bei der Anwendung von Arbeitsvorschriften (z. B. kein korrektes Beimpfungsniveau usw.);
- Spezifität der (Lebensmittel-)Einheit, z. B. sehr anspruchsvolle (Lebensmittel-)Einheit, die bei der Erstverdünnung einen höheren Verdünnungsfaktor erfordert;
- Feststellung, ob mithilfe des Verfahrens die Zulässigkeitsgrenze von 1 cfu/Prüfmenge überhaupt erreicht werden kann. Bei einigen Verfahren ist der Erhalt einer LOD_{50} von 1 cfu/Prüfmenge nicht möglich (z. B. bei *Campylobacter*);
- usw.

Nach Feststellung der Probleme werden Korrekturmaßnahmen ergriffen und die Prüfung wiederholt.

Im Untersuchungsbericht können dann (auf der Grundlage der Untersuchungen, z. B. der Ursachenanalyse) entsprechende Informationen als Erklärung für die Ergebnisse bereitgestellt werden.

Wenn eine (Lebensmittel-)Einheit nicht verifiziert werden kann, wird empfohlen, dass sich das Anwenderlabor mit einer für das Verfahren zuständigen Institution in Verbindung setzt, z. B. mit einem Normungsinstitut, dem Zulieferer oder einer Zertifizierungsstelle.

6 Quantitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung

6.1 Bestimmung der Präzision (der laborinternen Vergleichpräzision)

6.1.1 Allgemeines

Die Bestimmung der Präzision (der laborinternen Vergleichpräzision) ist nur bei der Verifizierung der Implementierung anwendbar.

Die Präzision umfasst die Eigenschaften Wiederholpräzision und Vergleichpräzision. Bei der Verifizierung der Implementierung wird nur die Vergleichpräzision berücksichtigt. Da diese in einem einzelnen Labor durchgeführt wird, wird das Ergebnis als laborinterne Vergleichpräzision (S_{IR} , en: intralaboratory reproducibility) bezeichnet. Die Bestimmung der laborinternen Vergleichpräzision (S_{IR}) basiert auf den Angaben in ISO/CD 19036, 4.2.1, „Reproducibility standard deviation derived from intralaboratory experiments“ (Standardabweichung der Vergleichpräzision bei laborinternen Versuchen).

ANMERKUNG Im Zusammenhang mit der Verifizierung der Implementierung ist die Bestimmung der laborinternen Vergleichpräzision (S_{IR}) nur für eine (Lebensmittel-)Einheit erforderlich. Allerdings sind ISO 19036 umsetzende Anwenderlabore verpflichtet, für andere (Lebensmittel-)Einheiten auch die Messungenauigkeit zu bestimmen. Weitere Informationen können ISO/CD 19036 entnommen werden.

Bei der in der Verifizierung der Implementierung verwendeten (Lebensmittel-)Einheit kann es sich um eine beliebige das Anwenderlabor betreffende (Lebensmittel-)Einheit handeln.

Während der Verifizierung der Implementierung wird die gesamte technische Arbeitsvorschrift wie beschrieben befolgt. Hierzu zählt auch die Bestätigungsprüfung. Jede einzelne Prüfmenge muss bestätigt werden.

6.1.2 Versuchsaufbau

Die technische Arbeitsvorschrift muss wie folgt umgesetzt werden (siehe auch Anhang D.1 zu weiteren Anleitungen und Beispielen).

Es sind wenigstens 10 Laborproben erforderlich, die aus unterschiedlichen Chargen aber von einer (Lebensmittel-)Einheit stammen. Unter Umständen können weitere Proben geprüft werden, um mögliche Verluste bei einigen Proben aufgrund von Praxisfehlern oder Missgeschicken während der Prüfung auszugleichen.

Die verwendeten Kontaminationsniveaus müssen dem Bereich der natürlichen Kontamination entsprechen, die in den vom Anwenderlabor geprüften Proben festgestellt wurden.

Jede Laborprobe (bzw. jede Untersuchungsprobe) muss zunächst homogenisiert werden, bevor zwei Prüfmengen entnommen werden (siehe Bild 3). Die Homogenisierung ist entscheidend, um sicherzustellen, dass die Mikroorganismen gleichmäßig verteilt sind. Bei flüssigen Produkten muss die Homogenisierung durch Schütteln der Laborprobe (bzw. der Untersuchungsprobe) von Hand (z. B. 25-mal in einem Bogen von 25 cm) erfolgen. Bei festen Produkten kann die Homogenisierung mithilfe von mechanischen Mitteln erfolgen. Hierzu könnten Stomacher®-Homogenisatoren und Mixer zählen. Einzelheiten können den Verfahren in der Normenreihe ISO 6887 entnommen werden.

Falls eine künstliche Kontamination zum Einsatz kommt, wird die Erstverdünnung jeder Prüfmenge mit einem bekannten Beimpfungsniveau des betreffenden Stamms beimpft.

Natürlich kontaminierte Prüfmengen können unmittelbar nach der Homogenisierung der Laborprobe (bzw. der Untersuchungsprobe) analysiert werden.

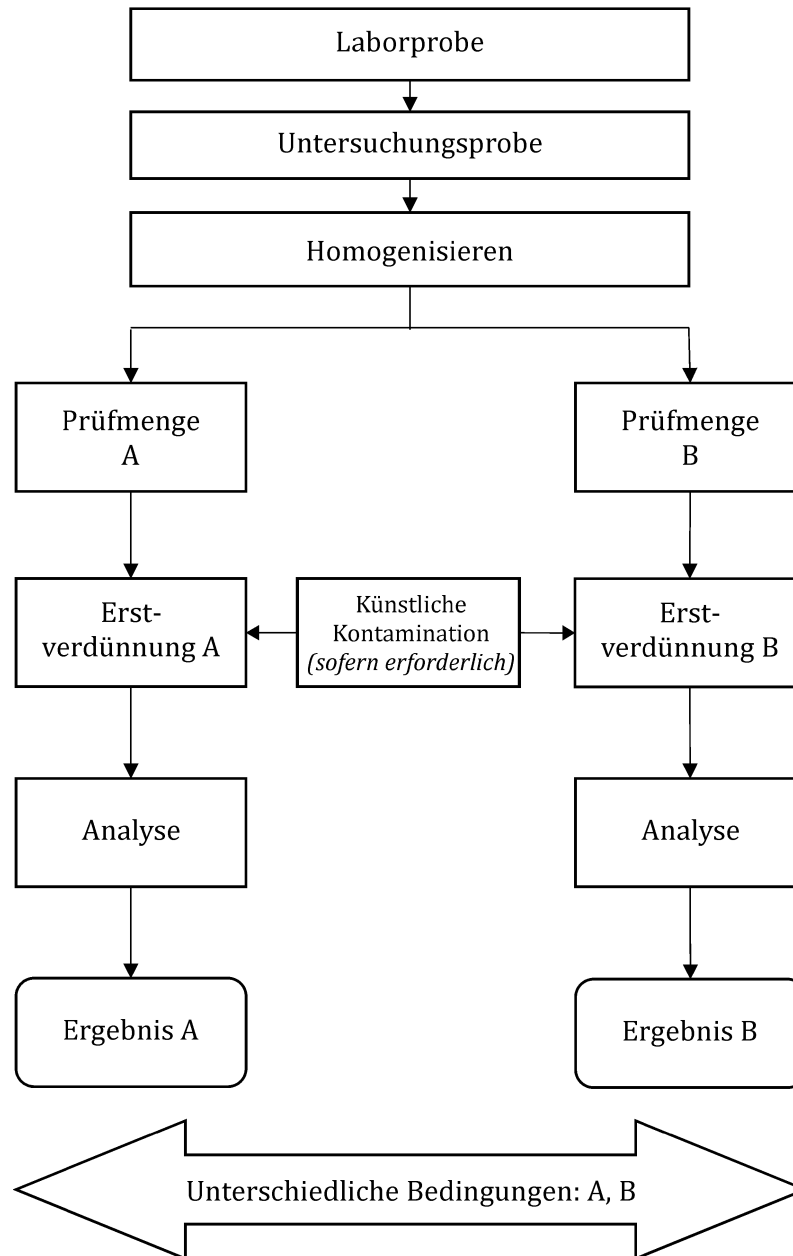


Bild 3 — Arbeitsvorschrift für den Versuch zur Schätzung der Standardabweichung der (laborinternen) Vergleichpräzision (S_R)

Wie aus Bild 3 hervorgeht, werden Untersuchungsproben bei mikrobiologischen Untersuchungen nicht so häufig verwendet. In solchen Fälle wird die Laborprobe unmittelbar für die Homogenisierung verwendet.

Die bei der Analyse der Prüfmengen A und B geltenden Prüfbedingungen müssen sich im Rahmen des Anwendungsbereichs der Validierung in so vielen Punkten wie möglich unterscheiden. Dies gilt unter anderem für:

- 1) Techniker;
- 2) Chargen der Nährmedien und Reagenzien (optional: sofern relevant, können für die Beimpfung verschiedener Erstverdünnungen auch unterschiedliche Stämme verwendet werden); und
- 3) Prüfgeräte (Inkubatoren, Vortex-Mischer, Pipetten usw.).

Die Prüfbedingungen 1 und 2 gelten bei einem Verfahren als die Ursachen für die unterschiedlichsten Ergebnisse und müssen variieren, sofern das Anwenderlabor nichts Anderslautendes darstellen kann. Prüfbedingung 3 muss insofern variieren, als im Anwenderlabor hierzu entsprechende Prüfgeräte vorhanden sein müssen. Falls die Kontamination der (Lebensmittel-)Einheit als ausreichend stabil dargestellt werden kann, kann die Analyse an unterschiedlichen Tagen durchgeführt werden. Die Ergebnisse müssen nach den Angaben in 6.1.6 analysiert werden.

6.1.3 Auswahl von (Lebensmittel-)Einheiten

Für die Verifizierung der Implementierung wird eine (Lebensmittel-)Einheit benötigt. Dafür kann eine beliebige für das Anwenderlabor relevante (Lebensmittel-)Einheit ausgewählt werden. Der Grund ist, dass die laborinterne Vergleichpräzision (S_{IR}) mit der laborübergreifenden Vergleichpräzision (S_R) aus der Laborvergleichsuntersuchung verglichen wird. Die laborübergreifende Vergleichpräzision (S_R) gibt die technische Unsicherheit nach der Definition in ISO/CD 19036 an. Dieser Wert ist von einer bestimmten (Lebensmittel-)Einheit unabhängig.

6.1.4 Natürliche Kontamination

Wann immer es möglich ist, werden natürlich kontaminierte Einheiten verwendet. Für die ausgewählten (Lebensmittel-)Einheiten müssen die Kontaminationsniveaus der einzelnen ausgewerteten Prüfmengen in den Bereich der natürlichen Kontamination fallen, die bei den im Anwenderlabor analysierten Laborproben festgestellt wurden.

Falls das erwartete Niveau der natürlichen Kontamination bei der Prüfmenge weniger als 10 cfu/g beträgt, wird eine künstliche Kontamination verwendet, um dem Anwendungsbereich des Verfahrens zu entsprechen (siehe 6.1.5).

6.1.5 Künstliche Kontamination

6.1.5.1 Auswahl des Stamms

Die bei der Verifizierung verwendeten (Bakterien-)Stämme sind vorzugsweise von Quellen zu entnehmen, die mit der zu verifizierenden (Lebensmittel-)Einheit im Zusammenhang stehen.

Mögliche Quellen können folgende sein:

- Kultursammlungen;
- Sammlungen des Anwenderlabors;
- Referenzmaterial (einschließlich handelsübliches Referenzmaterial, z. B. gefriergetrocknetes Material mit bekannter Konzentration).

Die Auswahl und Charakterisierung der Stämme muss sich nach den in ISO 7218 angegebenen Anforderungen richten. Vorzugsweise wird ein Stamm je (Lebensmittel-)Einheit verwendet.

6.1.5.2 Beimpfung der Prüfmenge

Als Beispiel für geeignete Verfahren zur Herstellung von Inokula wird die folgende Anleitung aufgeführt. Bei der Beimpfung der Prüfmenge müssen die verwendeten Kontaminationsniveaus dem Bereich der natürlichen Kontamination entsprechen, die in den vom Anwenderlabor geprüften Proben festgestellt wurden.

Der ausgewählte Stamm wird in einem Nährmedium unter Bedingungen gezogen, die ein optimales Wachstum des Stamms ermöglichen (z. B. in einer Übernachtskultur). Dabei sind die Verfahren aus ISO 11133 zu beachten.

Die Kultur wird auf nicht selektiven Medien ausgezählt, um die Konzentration des Stamms zu bestimmen. Dabei wird davon ausgegangen, dass dieses Konzentrationsniveau konsistent erreicht werden kann, wenn die gleichen Kulturbedingungen verwendet werden.

Es werden mehrere Übernachtkulturen hergestellt. Dabei ist die zuvor bestimmte Konzentration zu berücksichtigen, damit Verdünnungen hergestellt werden können, die dem repräsentativen Bereich der natürlichen Kontamination entsprechen. Dieser Schritt ist nicht erforderlich, wenn die Wachstumsbedingungen des Stamms im Anwenderlabor allgemein bekannt sind (z. B. Stabilität 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 muss die Verdünnung gut durchgemischt werden, damit eine gleichmäßige Verdünnung des Inokulums sichergestellt ist. Die Verwendung belasteter Kulturen wird empfohlen, ist aber nicht zwingend erforderlich.

BEISPIEL Ein Anwenderlabor möchte das Auszählverfahren für Enterobakterien nach ISO 21528-2 verifizieren. Die Validierung dieses Verfahrens wurde mithilfe von je einer (Lebensmittel-)Einheit aus fünf (Lebensmittel-)Kategorien durchgeführt:

- 1) (Lebensmittel-)Kategorie: rohes Fleisch und küchenfertige Fleischprodukte (außer Geflügel); (Lebensmittel-)Art: Frischfleisch (nicht verarbeitet); (Lebensmittel-)Einheit: rohes Schweinekotelett.
- 2) (Lebensmittel-)Kategorie: Eier und Eierzeugnisse (Eiderivate); (Lebensmittel-)Art: Eier (nicht verarbeitet); (Lebensmittel-)Einheit: Schaleneier.
- 3) (Lebensmittel-)Kategorie: Heimtierfutter und Futtermittel; (Lebensmittel-)Art: Zutaten tierischer Herkunft; (Lebensmittel-)Einheit: Fleisch- und Knochenmehl.
- 4) (Lebensmittel-)Kategorie: Wärmebehandelte Milch und Milchprodukte; (Lebensmittel-)Art: Produkte auf der Basis von pasteurisierter Milch; (Lebensmittel-)Einheit: Pasteurisierte Milch.
- 5) (Lebensmittel-)Kategorie: Schokolade, Backwaren und Süßwaren; (Lebensmittel-)Art: Gebäck; (Lebensmittel-)Einheit: Tiramisu.

Für die Verifizierung der Implementierung wurde die [in der Validierungsuntersuchung geprüfte] (Lebensmittel-)Einheit Tiramisu ausgewählt. Als Stamm für die künstliche Beimpfung wurde *E. coli* verwendet.

- Eine Übernachtkultur von *E. coli* ergibt nach der Auszählung auf nicht selektiven Medien ungefähr 10^9 cfu/ml. Diese Konzentration dient als Ausgangspunkt für die Verdünnungen, mit denen die Prüfmenge beimpft wird.
- Auf der Grundlage des in der Validierungsuntersuchung verwendeten Kontaminationsbereichs wird das Tiramisu mit 30 ($1,5 \log_{10}$) cfu/g bis 30 000 ($4,5 \log_{10}$) cfu/g beimpft.
- Es werden mindestens zehn (nach Marken und Chargen) unterschiedliche Tiramisu-Laborproben hergestellt. Jede wird in zwei Prüfmengen A und B aufgeteilt (siehe Bild 3). Beide aus einer Laborprobe stammenden Prüfmengen A und B (siehe Bild 3) werden mit dem gleichen Niveau beimpft. Jeder Satz der 10 oder mehr Laborproben wird unterschiedlich mit 30 cfu/g bis 30 000 cfu/g beimpft. Die Kulturen werden in die Erstverdünnung geimpft.
- Hierzu wird eine Übernachtkultur hergestellt, die (auf der Grundlage der Ergebnisse vorheriger Auszählungen, siehe Anhang D) mutmaßlich 10^9 cfu/ml enthält.

- Zur Kontamination mit 30 cfu/g werden 6 fortlaufend dezimale Verdünnungen der Übernachtskultur hergestellt, um das anfängliche Beimpfungsniveau von 10^9 cfu/ml auf 10^3 cfu/ml zu verringern.
- Dann werden die Erstverdünnungen der beiden Prüfmengen (zu 10 g) jeder Laborprobe hergestellt.
- Jeder der beiden Erstverdünnungen wird mit 0,3 ml der Kulturverdünnung beimpft. Die unterschiedlichen Kontaminationsniveaus im Bereich 30 cfu/g bis 30 000 cfu/g können entweder durch unterschiedliche Verdünnungen oder durch verschiedene Beimpfungsmengen erhalten werden.

6.1.6 Ergebnisse

Die laborinterne Vergleichpräzision (S_{IR}) wird anhand von mindestens 10 Laborproben nach der folgenden Gleichung berechnet.

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2p} \sum (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

Dabei ist

S_{IR} die laborinterne Vergleichpräzision;

i der Index der Laborprobe, mit $i = 1$ bis p ($p \geq 10$);

p die Anzahl der Proben;

y_{iA}, y_{iB} die logarithmisch umgewandelten Daten, in $\log_{10}$ (cfu/g) oder $\log_{10}$ (cfu/ml), aus den Bedingungen A bzw. B.

Tabelle 8 zeigt ein Beispiel für eine manuelle Berechnung. Prüfungsergebnisse mit niedrigen Anzahlen (z. B. indikative Ergebnisse) können für die Berechnung von S_{IR} nicht verwendet werden. Die Kriterien für niedrige Anzahlen gehen aus ISO 7218 hervor.

6.1.7 Annahmekriterien

Die laborinterne Vergleichpräzision (S_{IR}) des verifizierten Verfahrens muss kleiner oder gleich der laborübergreifenden Vergleichpräzision (S_R) der homogensten (Lebensmittel-)Einheit sein, die in der Validierungsuntersuchung verwendet wurde. Die homogenste (Lebensmittel-)Einheit wird definiert als die (Lebensmittel-)Einheit mit dem niedrigsten S_R -Mittelwert bei den Beimpfungsniveaus.

ANMERKUNG Die Annahmekriterien werden in Abschnitt 7 zusammengefasst.

BEISPIEL Das Anwenderlabor hat 12 Laborproben Tiramisu mithilfe des Versuchsaufbaus aus Bild 3 auf Gehalt von *Enterobacteriaceae* (nach den Angaben in ISO 21528-1) bewertet. Die folgenden (als cfu/g der Laborprobe berechneten) Ergebnisse wurden dabei erhalten (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 — Prüfergebnisse

Labor- proben- nummer	Erwartetes Kontaminations- niveau (cfu/g)	Ergebnis A (x_{iA}) (cfu/g)	Ergebnis B (x_{iB}) (cfu/g) ^c	Log Ergebnis A $y_{iA} = \log_{10}(x_{iA})$	Log Ergebnis B $y_{iB} = \log_{10}(x_{iB})$
1	30	10	30	1	1,477 121
2	300	110	182	2,041 393	2,260 071
3	300	410	620	2,612 784	2,792 392
4	600	640	330	2,806 18	2,518 514
5	600	690	570	2,838 849	2,755 875
6	600	780	640	2,892 095	2,806 18
7	600	620	1 300	2,792 392	3,113 943
8	600	870	1 500	2,939 519	3,176 091
9	6 000	8 600	6 400	3,934 498	3,806 18
10	6 000	16 000	5 000	4,204 12	3,698 97
11	6 000	> 15 000	13 400	> 4,176 091	4,127 105
12	30 000	20 000	32 000	4,301 03	4,505 15

- Die Ergebnisse der Laborproben 1 und 11 können nicht verwendet werden, da eine Anzahl entweder zu hoch („>-Ergebnis) oder zu niedrig war (unterhalb des zulässigen Anzahlbereichs nach ISO 7218). Damit verbleiben 10 Laborproben für die Berechnung.
- Auf der Grundlage der 10 verbliebenen Laborproben kann die S_{IR} wie in Tabelle 7 dargestellt berechnet werden.

Tabelle 7 — Berechnung von S_{IR}

Laborproben- nummer	Log Ergebnis A $y_{iA} = \log_{10}(x_{iA})$	Log Ergebnis B $y_{iB} = \log_{10}(x_{iB})$	Absolute Differenz $ y_{iA} - y_{iB} $	Quadierte Differenz $ y_{iA} - y_{iB} ^2$
1	1,000 000	1,477 121	keine Anwendung	keine Anwendung
2	2,041 393	2,260 071	0,218 678	0,047 82
3	2,612 784	2,792 392	0,179 608	0,032 259
4	2,806 18	2,518 514	0,287 666	0,082 752
5	2,838 849	2,755 875	0,082 974	0,006 885
6	2,892 095	2,806 18	0,085 915	0,007 381
7	2,792 392	3,113 943	0,321 551	0,103 396
8	2,939 519	3,176 091	0,236 572	0,055 966
9	3,934 498	3,806 18	0,128 318	0,016 466
10	4,204 12	3,698 97	0,505 15	0,255 177
11	> 4,176 091	4,127 105	keine Anwendung	keine Anwendung
12	4,301 03	4,505 15	0,204 12	0,041 665
			Summe	0,649 766
			Summe/(2 × 10)	0,032 488
			$S_{IR} = \sqrt{(0,032 488)}$	0,18

- Die erhaltene S_{IR} von 0,18 wird mit den Ergebnissen der Validierungsuntersuchung verglichen (die Daten werden aus ISO 21528-2 übernommen). Tabelle 8 enthält die S_R -Werte, die bei dieser Validierungsuntersuchung erhalten wurden.

Tabelle 8 — Zusammenfassung der S_R -Werte aus der Validierungsuntersuchung für ISO 21528-2

(Lebensmittel-) Einheit	S_R -Werte aus der Validierungsuntersuchung			
	Niedriges Beimpfungsniveau	Mittleres Beimpfungsniveau	Hohes Beimpfungsniveau	Mittelwert der drei Beimpfungsniveaus
pasteurisiertes Flüssigei	0,32	0,50	0,48	0,43
Hackfleisch	0,28	0,36	0,57	0,40
(Tier-)Futtermittel	0,18	0,17	0,20	0,18
pasteurisierte Milch	0,24	0,18	0,19	0,20
Tiramisu	0,22	0,28	0,13	0,21

- Bei diesem Prüfungsaufbau darf der Einfluss der (Lebensmittel-)Einheit nicht berücksichtigt werden. Die erhaltene S_{IR} wird mit der S_R einer homogenen (Lebensmittel-)Einheit verglichen. In diesem Beispiel war die homogene (Lebensmittel-)Einheit ein (Tier-)Futtermittel (der Mittelwert der 3 Beimpfungsniveaus betrug 0,18).
- Die in der Verifizierungsuntersuchung festgestellte S_{IR} (0,18) wird mit der S_R mit einem Wert von 0,18 aus der Validierungsuntersuchung verglichen.
- Da die S_{IR} der Verifizierungsuntersuchung (0,18) gleich 0,18 ist, lautet die Schlussfolgerung, dass die Präzision des in diesem Anwenderlabor verwendeten Verfahrens annehmbar ist.

6.1.8 Ursachenanalyse

Wenn die Ergebnisse den Annahmekriterien nicht entsprechen, wird eine Ursachenanalyse durchgeführt, um eine Erklärung für die beobachteten Ergebnisse zu erhalten.

Diese Ursachenanalyse könnte wie folgt durchgeführt werden:

- Feststellung von Fehlern, die auf menschliche Faktoren zurückzuführen sind;
- Feststellung von Fehlern, die auf verwendete Geräte zurückzuführen sind;
- Feststellung von Fehlern, die auf Mangel an guter Laborpraxis zurückzuführen sind;
- Feststellung von Analysefehlern bei der Anwendung von Arbeitsvorschriften (z. B. kein korrektes Beimpfungsniveau usw.).

Nach Feststellung der Lücke werden Korrekturmaßnahmen ergriffen und die Prüfung wiederholt.

Im Untersuchungsbericht können dann (auf der Grundlage der Untersuchungen, z. B. der Ursachenanalyse) entsprechende Informationen als Erklärung für die Ergebnisse bereitgestellt werden.

Wenn eine (Lebensmittel-)Einheit nicht verifiziert wird, so wird empfohlen, dass sich das Anwenderlabor mit einer für das Verfahren zuständigen Institution in Verbindung setzt, z. B. mit einem Normungsinstitut, dem Zulieferer oder einer Zertifizierungsstelle.

6.2 Geschätzte systematische Abweichung

6.2.1 Allgemeines

Die Bestimmung der geschätzten systematischen Abweichung (eBias) ist nur bei der Verifizierung von (Lebensmittel-)Einheiten anwendbar.

Während der Verifizierung des Verfahrens wird die technische Arbeitsvorschrift wie beschrieben befolgt. Hierzu zählt ggf. auch die Bestätigungsprüfung. Jede einzelne Prüfmenge muss bestätigt werden.

6.2.2 Prüfaufbau

Die technische Arbeitsvorschrift muss wie folgt umgesetzt werden (siehe auch Anhang D.2 zu weiteren Anleitungen und Beispielen):

- Auswahl der zu prüfenden (Lebensmittel-)Einheit(en).

- Künstliche Kontamination der (Lebensmittel-)Einheit(en) mit drei Beimpfungsniveaus. Die künstliche Kontamination wird an der Erstverdünnung durchgeführt. Jedes Beimpfungsniveau wird zweimal ausgeführt (für jedes Niveau gibt es dann zwei Erstverdünnungen A und B).
- Das zu verifizierende Verfahren wird gleichzeitig mit der künstlich kontaminierten (Lebensmittel-) Einheit und mit der zur Beimpfung der (Lebensmittel-)Einheit verwendeten beimpften Verdünnung durchgeführt.
- Doppelte Prüfung der nicht beimpften Prüfmenge zur Bestimmung des Hintergrund-Kontaminationsniveaus.

6.2.3 Auswahl von (Lebensmittel-)Einheiten

Bei der Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit muss das Anwenderlabor zumindest eine, im besten Fall anspruchsvolle, (Lebensmittel-)Einheit prüfen. Diese muss aus den (Lebensmittel-)Kategorien stammen, die im Anwendungsbereich der Laboranwendung enthalten ist (siehe 4.4). Anhang B enthält Anleitungen zur Auswahl von anspruchsvollen (Lebensmittel-)Einheiten.

6.2.4 Künstliche Kontamination

6.2.4.1 Auswahl von Stämmen

Die bei der Verifizierung verwendeten (Bakterien-)Stämme sind vorzugsweise von Quellen zu entnehmen, die mit der zu verifizierenden (Lebensmittel-)Einheit im Zusammenhang stehen. Mögliche Quellen können folgende sein:

- Kultursammlungen;
- Sammlungen des Anwenderlabors;
- Referenzmaterial (einschließlich handelsübliches Referenzmaterial, z. B. gefriergetrocknetes Material mit bekannter Konzentration).

Die Auswahl und Charakterisierung der Stämme muss sich nach den in ISO 7218 angegebenen Anforderungen richten. Vorzugsweise ist für jede einzelne zu prüfende (Lebensmittel-)Einheit ein anderer Stamm zu verwenden.

6.2.4.2 Beimpfung der Prüfmengen

Als Beispiel für geeignete Verfahren zur Herstellung von Inokula wird die folgende Anleitung aufgeführt. Der ausgewählte Stamm wird in einem Nährmedium unter Bedingungen gezogen, die ein optimales Wachstum des Stamms ermöglichen (z. B. in einer Übernachtskultur). Dabei sind die Verfahren aus ISO 11133 zu beachten.

Jede beimpfte Verdünnung wird auf nicht selektiven Medien ausgezählt, um die verwendeten Beimpfungsniveaus zu bestätigen. Diese werden als cfu/g oder als cfu/ml ausgedrückt.

Es werden mehrere Kulturen unter den gleichen Bedingungen hergestellt. Dabei ist die zuvor bestimmte Konzentration zu berücksichtigen, damit Verdünnungen hergestellt werden können, die den beabsichtigten Kontaminationsbereich abdecken. Dieser Schritt ist nicht erforderlich, wenn die Wachstumsbedingungen des Stamms im Anwenderlabor allgemein bekannt sind (z. B. Stabilität 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 muss die Verdünnung gut durchgemischt werden, damit eine gleichmäßige Verdünnung des Inokulums sichergestellt ist. Die Verwendung belasteter Kulturen wird empfohlen, ist aber nicht zwingend erforderlich.

6.2.4.3 Herstellung der Prüfmengen

Die Beimpfungsniveaus müssen ausgewählt und auf der Grundlage der in Routineanalysen erwarteten Beimpfungsniveaus begründet werden.

Für diese Arbeit sind drei Beimpfungsniveaus erforderlich. Auswahl der unteren und oberen Niveaus zur Darstellung der unteren und oberen Niveaus, die ein Anwenderlabor während der Routinearbeit mit diesem Verfahren erwarten würde.

Herstellung von mehr als drei Beimpfungsniveaus (z. B. fünf oder sechs), sodass das Anwenderlabor mit höherer Wahrscheinlichkeit die drei Niveaus erhält, die für Vergleichsuntersuchungen erforderlich sind.

BEISPIEL Ein Anwenderlabor hat entschieden, dass es in eingereichten Proben üblicherweise zwischen 10^2 und 10^6 cfu/g finden wird. Diese Untersuchung erfordert die Beimpfung der Erstverdünnung mit folgenden Beimpfungsniveaus: 10^1 cfu/ml, 10^3 cfu/ml und 10^5 cfu/ml (als Erstverdünnung dient eine 10-fache Verdünnung der Prüfmenge, entsprechend 10^2 cfu/g, 10^4 cfu/g und 10^6 cfu/g der Prüfmenge). Dabei wird angenommen, dass die Prüfmenge ein Gewicht von 10 g hat und das endgültige Volumen der Erstverdünnung bei 100 ml liegt.

- Es wurde eine frische Übernachtskultur des erforderlichen Mikroorganismus hergestellt (siehe 6.1.5.1) und aufgrund von früheren Messungen bzw. aus Erfahrung angenommen, dass 10^7 cfu/ml enthalten sind. Zur Abdeckung der angenommenen Bereiche von 10^1 cfu/ml bis 10^6 cfu/ml wurden geeignete Verdünnungen hergestellt.
- 1 ml jeder Verdünnung der Kultur wurde in je zwei Erstverdünnungen übertragen, sodass die folgenden Erstverdünnungen mit den angenommenen Konzentrationen in doppelter Ausführung vorliegen: 10^0 cfu/ml, 10^1 cfu/ml, 10^2 cfu/ml, 10^3 cfu/ml, 10^4 cfu/ml und 10^5 cfu/ml (dies entsprach 10^1 cfu/g bis 10^6 cfu/g in den Prüfmengen). Eine nicht beimpfte Prüfmenge war ebenfalls enthalten.
- Die beimpften Erstverdünnungen wurden dann anhand des zu verifizierenden Verfahrens ausgezählt.
- Die für die Beimpfung der Erstverdünnungen verwendeten Verdünnungen wurden ebenfalls auf einem nicht selektiven Medium ausgestrichen, um die tatsächliche Konzentration des Mikroorganismus zu erhalten.
- Nach der Inkubation und der Auszählung der beimpften Kulturen wurde festgestellt, dass die Übernachtskultur de facto 10^8 cfu/ml enthielt (also $1 \log_{10} >$ das angenommene Kontaminationsniveau). Daher lagen die tatsächlichen Niveaus bei 10^1 cfu/ml bis 10^7 cfu/ml und die kalkulierten Niveaus in den Prüfmengen bei 10^2 cfu/g bis 10^8 cfu/g.
- Das Anwenderlabor war anschließend in der Lage, die Ergebnisse für 10^2 cfu/g, 10^4 cfu/g und 10^6 cfu/g der Prüfmenge (10^1 cfu/ml, 10^3 cfu/ml und 10^5 cfu/ml der Erstverdünnungen) auszuwählen und die tatsächlich ausgezählten Ergebnisse des zu verifizierenden Verfahrens mit den Zählungen der Inokula auf einem nicht selektiven Medium zu vergleichen.

6.2.5 Ergebnisse

Die Ergebnisse müssen in $\log_{10}$ cfu/g oder in $\log_{10}$ cfu/ml ausgedrückt werden. Die Ergebnisse des zu verifizierenden Verfahrens mit künstlich kontaminierten (Lebensmittel-)Einheiten werden mit den Ergebnissen der mit dem gleichen Verfahren geprüften beimpften Verdünnung verglichen.

6.2.6 Annahmekriterien

Es wird erwartet, dass bei jedem Kontaminationsniveau die Differenz zwischen den Ergebnissen des zu verifizierenden Verfahrens mit künstlich kontaminierten (Lebensmittel-)Einheiten und denen der mit dem gleichen Verfahren geprüften beimpften Verdünnung bei höchstens $0,5 \log_{10} \text{ cfu/g}$ liegt.

ANMERKUNG Die Annahmekriterien werden in Abschnitt 7 zusammengefasst.

BEISPIEL Ein Anwenderlabor möchte mit der (Lebensmittel-)Einheit „gekochte Teigwaren“ die geschätzte systematische Abweichung (eBias) des Verfahrens für die Auszählung von *Enterobacteriaceae* anhand eines validierten Alternativverfahrens verifizieren. Der erwartete Kontaminationsbereich liegt zwischen 10^2 cfu/g und 10^4 cfu/g . Das Ergebnis der Prüfungen ist in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9 — Prüfergebnisse

	Ergebnisse ($\log_{10} \text{ cfu/g}$)		Mittleres Ergebnis je Charge ($\log_{10} \text{ cfu/g}$)		Differenz zwischen dem zu verifizierenden Verfahren mit einer künstlich kontaminierten (Lebensmittel-) Einheit und der beimpften Verdünnung
	Mit einer künstlich kontaminierten (Lebensmittel-) Einheit zu verifizierendes Verfahren	Mit einer beimpften Lösung [ohne (Lebensmittel-) Einheit] zu verifizierendes Verfahren	Mit einer künstlich kontaminierten (Lebensmittel-) Einheit zu verifizierendes Verfahren	Mit einer beimpften Lösung [ohne (Lebensmittel-) Einheit] zu verifizierendes Verfahren	
Laborprobe 1 (Charge 1), Prüfmenge 1	1,87	2,15	2,06	2,17	–0,11
Laborprobe 1 (Charge 1), Prüfmenge 2	2,25	2,20			
Laborprobe 2 (Charge 2), Prüfmenge 1	3,93	4,23	3,99	4,29	–0,30
Laborprobe 2 (Charge 2), Prüfmenge 2	4,04	4,35			
Laborprobe 3 (Charge 3), Prüfmenge 1	3,73	3,59	3,68	3,62	0,06
Laborprobe 3 (Charge 3), Prüfmenge 2	3,63	3,65			

Die Ergebnisse zeigen, dass die absolute Differenz der beiden Verfahren bei jedem Kontaminationsniveau bei weniger als $0,5 \log_{10}$ liegt. Damit funktioniert das zu verifizierende Verfahren in diesem Anwenderlabor fehlerfrei.