

DIN EN ISO 16140-6

ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2018-03-05

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Verfahrensvalidierung –
Teil 6: Arbeitsvorschrift für die Validierung (urheberrechtlich geschützter)
Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung
(ISO/DIS 16140-6:2017),
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 16140-6:2017**

Microbiology of the food chain –
Method validation –

Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures (ISO/DIS 16140-6:2017);
German and English version prEN ISO 16140-6:2017

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Validation des méthodes –

Partie 6: Protocole pour la validation des méthodes alternatives (propriétaires) pour confirmation et identification microbiologique (ISO/DIS 16140-6:2017);
Version allemande et anglaise prEN ISO 16140-6:2017

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 64 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 16140-6:2017) 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 nationale Gremium 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 6579-1	siehe DIN EN ISO 6579-1
ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 11133	siehe DIN EN ISO 11133
ISO 11290-1	siehe DIN EN ISO 11290-1
ISO 11290-2	siehe DIN EN ISO 11290-2
ISO 16140-1:2016	siehe DIN EN ISO 16140-1:2016-11
ISO 16140-2	siehe DIN EN ISO 16140-2
ISO 17468:2016	siehe DIN EN ISO 17468:2016-11
ISO/TR 6579-3	siehe DIN CEN ISO/TR 6579-3 (DIN SPEC 10525)

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 11133, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

DIN EN ISO 11290-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von Listeria monocytogenes und von Listeria spp. — Teil 1: Nachweisverfahren*

DIN EN ISO 11290-2, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren für den Nachweis und die Zählung von Listeria monocytogenes und von Listeria spp. — Teil 2: Zählverfahren*

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, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens*

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 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.*

— Leerseite —

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 6:
Arbeitsvorschrift für die Validierung (urheberrechtlich geschützter)
Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung
(ISO/DIS 16140-6:2017)**

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes — Partie 6 : Protocole pour la validation des méthodes alternatives (propriétaires) pour confirmation et identification microbiologique (ISO/DIS 16140-6:2017)

Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures (ISO/DIS 16140-6:2017)

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.9b

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich.....	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	9
4 Allgemeine Prinzipien für die Validierung von Bestätigungs- und Typisierungsverfahren.....	10
5 Stämme	12
6 Verfahrensvergleichsuntersuchung	12
6.1 Allgemeines	12
6.2 Auswahl der Prüfstämme	12
6.3 Untersuchung zum Maß der Inklusivität.....	13
6.3.1 Prüfung der Zielstämme	13
6.3.2 Familien-Ebene (ohne <i>Salmonella</i>)	13
6.3.3 Gattungs-Ebene (ohne <i>Salmonella</i>).....	13
6.3.4 Spezies-Ebene (ohne <i>Salmonella</i>).....	13
6.3.5 Ebene des mikrobiellen (Unter-)Typs (ohne <i>Salmonella</i>).....	13
6.3.6 Gattungs- oder Spezies-Ebene von <i>Salmonella</i>	14
6.3.7 Serotyp-Ebene von <i>Salmonella</i>	14
6.4 Untersuchung zum Maß der Exklusivität	14
6.4.1 Prüfung von Nicht-Zielstämmen	14
6.4.2 Familien-Ebene (ohne <i>Salmonella</i>)	14
6.4.3 Gattungs-Ebene (ohne <i>Salmonella</i>).....	14
6.4.4 Spezies-Ebene (ohne <i>Salmonella</i>).....	15
6.4.5 Ebene des mikrobiellen (Unter-)Typs (ohne <i>Salmonella</i>).....	15
6.4.6 Gattungs- und Spezies-Ebene von <i>Salmonella</i>	15
6.4.7 Serotyp-Ebene von <i>Salmonella</i>	15
6.5 Angabe und Auswertung der Ergebnisse.....	16
6.6 Auswertung.....	17
7 Ringversuch	18
7.1 Allgemeines	18
7.2 Erforderliche Datensätze.....	18
7.3 Protokoll	19
7.4 Darlegung der Ergebnisse	20
7.5 Auswertung und Bewertung.....	20
Anhang A (normativ) Bei der Auswahl von Stämmen für die Untersuchung zur Inklusivität und Exklusivität zu berücksichtigende Aspekte.....	22
Anhang B (informativ) Beispiel für ein alternatives Bestätigungsverfahren auf Spezies-Ebene (<i>Listeria monocytogenes</i>).....	24
Anhang C (informativ) Beispiel für ein alternatives Typisierungsverfahren für die Serotyp-Ebene von <i>Salmonella</i> (soll 15 unterschiedliche Serotypen erkennen).....	27
Anhang D (normativ) Übersicht über die verschiedenen Optionen bei der Validierung im Rahmen dieses Teils von ISO 16140 sowie die Zulässigkeitsgrenzen	30
Literaturhinweise.....	32

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 16140-6:2017) 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 16140-6:2017 wurde von CEN als prEN ISO 16140-6:2017 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 Liste aller Teile der Normenreihe ISO 16140 kann auf der ISO-Internetseite abgerufen werden.

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* [7], 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, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette*, 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 Teil 3 wird unterschieden zwischen der Verifizierung von in der Validierungsuntersuchung enthaltenen (Lebensmittel-)Einheiten und in der Validierungsuntersuchung nicht untersuchten aber im Geltungsbereich 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 von 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 16140-6 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 Einzel-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.

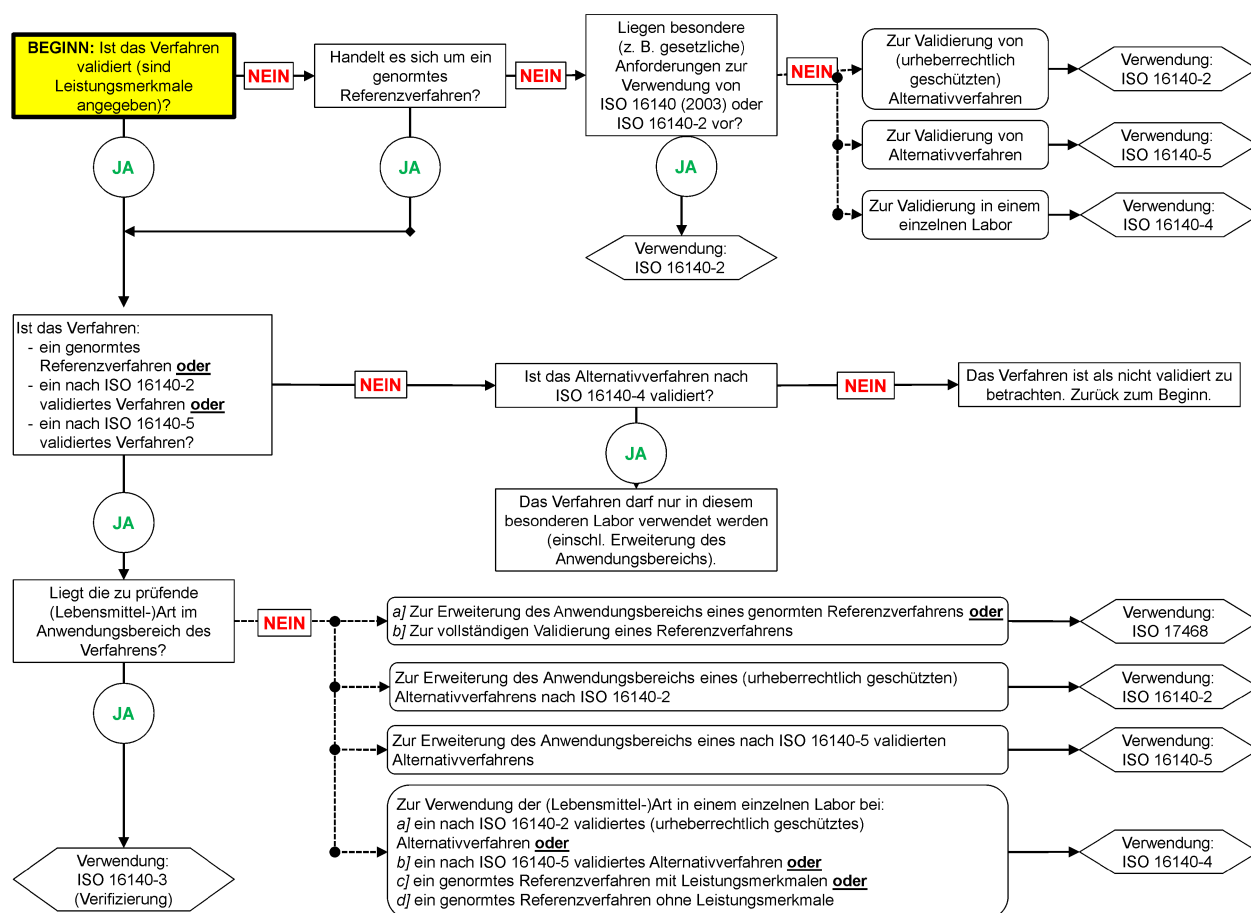


Bild 1 — Flussdiagramm zur Anwendung der verschiedenen Teile der Normenreihe ISO 16140

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 *Salmonella*) ist ebenfalls in Teil 6 von ISO 16140 enthalten.

Das in diesem Teil von ISO 16140 beschriebene Verfahren ist für die „vollständige“ Validierung (urheberrechtlich geschützter) Alternativverfahren für die mikrobiologische Bestätigung und Typisierung gedacht. Dieser Vorgang wird im Folgenden als „alternatives Bestätigungsverfahren“ bezeichnet. Der Vorgang der Verifizierung von alternativen Bestätigungsverfahren in Einzel-Labors wird in Teil 3 von ISO 16140 beschrieben.

Während der Validierungsuntersuchung wird die Leistung des alternativen Bestätigungsverfahrens mit der des Referenzbestätigungsverfahrens verglichen.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 16140 legt das allgemeine Prinzip und die technische Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer zum Großteil urheberrechtlich geschützter Bestätigungsverfahren in der Mikrobiologie der Lebensmittelkette fest. Dieser Teil von ISO 16140 vergleicht die Ergebnisse des alternativen Bestätigungsverfahrens mit denen des Referenzbestätigungsverfahrens.

Dieser Teil von ISO 16140 ist anwendbar auf die Validierung von alternativen Bestätigungsverfahren zur Analyse (Nachweis oder 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 und
- Proben aus dem Bereich der Primärproduktion.

Validierte alternative Bestätigungsverfahren können verwendet werden, um das Bestätigungsverfahren (ganz oder teilweise) zu ersetzen, das beschrieben ist:

- im Referenzverfahren und
- in einem Alternativverfahren, das nach Teil 2 von ISO 16140 [5] validiert worden ist, vorausgesetzt, eines der in der Validierungsuntersuchung des alternativen Bestätigungsverfahrens angegebenen Isolierungs-Agars wird dabei verwendet.

Darüber hinaus ist dieser Teil von ISO 16140 auch anwendbar auf die Validierung der alternativen Typisierungsverfahren, bei denen das Referenzverfahren beispielsweise ein serologisches Verfahren (z. B. zur Serotypisierung von *Salmonella*) oder ein molekulares Verfahren ist (z. B. zur Typisierung von Shigatoxin bildenden *E. coli*).

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

Validierungsuntersuchungen nach diesem Teil von ISO 16140 sollen nicht von Einzelbenutzer-Laboren sondern von Organisationen durchgeführt werden, die an der Verfahrensvalidierung beteiligt sind.

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 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 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

Zulässigkeitsgrenze

AL

(en: acceptability limit)

zulässige höchste positive oder negative Differenz zwischen dem Bezugswert (oder, falls nicht bekannt, dem anerkannten Bezugswert) einer Probe und einem einzelnen Ergebnis, das bei der Ausführung der Arbeitsanweisung eines Untersuchungsverfahrens erhalten wurde

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.1, modifiziert]

Anmerkung 1 zum Begriff: Anhang D enthält weitere Angaben zur Verwendung der Zulässigkeitsgrenze (AL) für diesen Teil von ISO 16140.

3.2

Bestätigungsverfahren

Reihe von festgelegten Prüfungen, die bei einem Stamm durchgeführt werden und deren zusammengefasste Ergebnisse zur endgültigen Bestätigung der Identität dieses Stamms verwendet werden

3.3

Bestätigungsprüfung

Einzelprüfung, die zur Verifizierung eines mutmaßlichen Ergebnisses durchgeführt wird

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.17, modifiziert]

Anmerkung 1 zum Begriff: Anhand der Ergebnisse einer Einzelprüfung ist es unter Umständen nicht möglich, die Identität des Stamms endgültig zu bestätigen.

3.4

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 Alternativverfahrens bestätigt wird

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.44, modifiziert]

3.5

Referenzbestätigungs- oder Typisierungsverfahren

Kombination von Bestätigungs- oder Typisierungsprüfungen, die durch das alternative Bestätigungs- oder Typisierungsverfahren ersetzt werden sollen

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Anzahl der Bestätigungsprüfungen hängt vom Referenzverfahren für die festgelegten Mikroorganismen ab. Die Anzahl der Bestätigungsprüfungen kann auch eins sein.

Anmerkung 2 zum Begriff: Ein detailliertes Beispiel ist in den Anhängen B und C angegeben.

Anmerkung 3 zum Begriff: Zur besseren Lesbarkeit wird der Text dieses Dokuments im Allgemeinen für die Validierung eines Bestätigungsverfahrens beschrieben (Anhang B). Sofern anwendbar, kann dies als Typisierungsverfahren verstanden werden (Anhang C).

3.6
mikrobieller (Unter-)Typ
Gruppe von (innerhalb einer Spezies) eng miteinander zusammenhängenden Mikroorganismen, die sich nach der Bestimmung z. B. durch eine serologische Prüfung (Serotyp) oder eine molekulare Prüfung (Genotyp) durch ihre gemeinsamen spezifischen Merkmale abheben

3.7
Zielstamm
Stamm, der in Übereinstimmung mit dem Anwendungsbereich des Referenzverfahrens festgelegt ist, von dem erwartet wird, dass er bei Anwendung des Alternativverfahrens bestätigt wird

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.74, modifiziert]

3.8
Typisierung
Verfahren zur Bestimmung eines bestimmten mikrobiellen (Unter-)Typs

4 Allgemeine Prinzipien für die Validierung von Bestätigungs- und Typisierungsverfahren

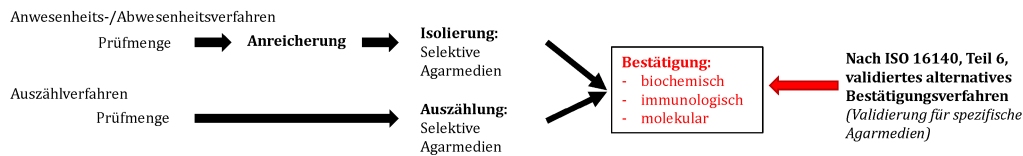
In der Validierungsuntersuchung wird das alternative Bestätigungsverfahren mit dem Bestätigungsverfahren verglichen, das im Referenzverfahren für die Auszählung oder die Erkennung bestimmter (Gruppen von) Mikroorganismen beschrieben ist.

Die Arbeitsvorschrift für die Validierung umfasst zwei Phasen:

- eine Vergleichsuntersuchung des alternativen Bestätigungsverfahrens gegenüber dem Referenzbestätigungsverfahren, das im organisierenden Labor durchgeführt wird (siehe Abschnitt 6);
- einen Ringversuch (siehe Abschnitt 7).

Die Arbeitsvorschrift für die Validierung muss die selektiven Agarmedien eindeutig angeben, deren 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 dargestellt wurde. Bild 2 zeigt die Möglichkeiten, bei denen ein nach ISO 16140, Teil 6, validiertes alternatives Bestätigungsverfahren verwendet werden kann (siehe Text in **roter Schrift**).

Referenzverfahren



Nach ISO 16140, Teil 2, validiertes Alternativverfahren

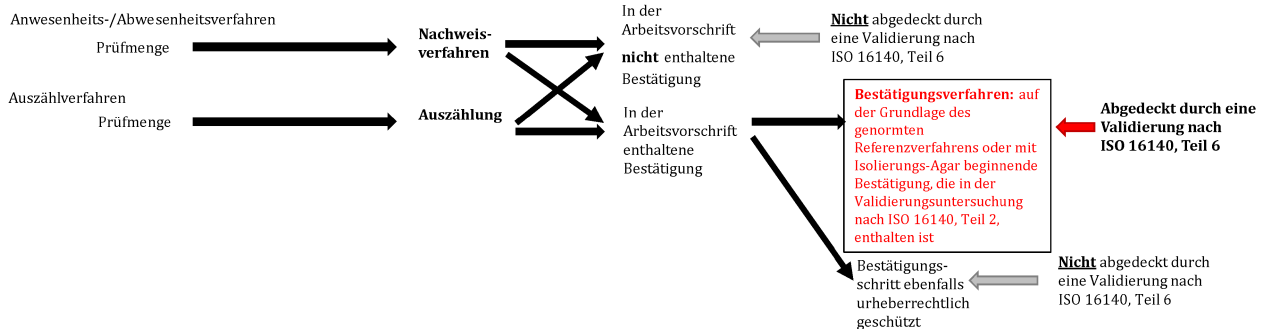


Bild 2 — Verwendung eines nach ISO 16140, Teil 6, validierten alternativen Bestätigungsverfahrens (siehe Text in roter Schrift)

BEISPIEL Anwendung eines validierten alternativen Bestätigungsverfahrens:

Ein auf PCR basiertes alternatives Bestätigungsverfahren wird validiert, um die biochemische Bestätigung für *Salmonella* nach der Beschreibung in ISO 6579-1 [1] zu ersetzen. In den Validierungsuntersuchung wurden XLD (Agar nach ISO 6579-1 vorgeschrieben) und BGA (Agar nach ISO 6579-1 optional) als Agarmedien verwendet, um die Bestätigung zu beginnen. Das validierte Bestätigungsverfahren kann unter den folgenden Bedingungen verwendet werden:

- 1) von Laboren, die nach ISO 6579-1 arbeiten, um die biochemische Bestätigung zu ersetzen, oder
- 2) von Laboren, die mit einem nach ISO 16140-2 validierten, zur biochemischen Bestätigung auf ISO 6579-1 verweisenden Alternativverfahren arbeiten, oder
- 3) von Laboren, die mit einem nach ISO 16140-2 validierten Alternativverfahren arbeiten, das die Bestätigung mit XLD- und/oder BGA-Agarmedien beginnt.

Das validierte Bestätigungsverfahren kann unter den folgenden Bedingungen **nicht** verwendet werden:

- 1) von Laboren, die mit einem nach ISO 16140-2 validierten Alternativverfahren arbeiten, das auf ein urheberrechtlich geschütztes Verfahren zur Bestätigung verweist (z. B. ein chromogenes Agarmedium), oder
- 2) von Laboren, die mit einem nach ISO 16140-2 validierten Alternativverfahren arbeiten, das auf andere Agarmedien verweist, um die Bestätigung zu beginnen (z. B. Hektoen-Agar), oder
- 3) von Laboren, die mit einem nach ISO 16140-2 validierten Alternativverfahren arbeiten, das auf ein nicht auf der Isolierung auf Agarmedien basierendes Bestätigungsverfahren verweist (sondern z. B. auf eine ELISA-Prüfung).

ANMERKUNG Sofern relevant, können in einer Untersuchung nach ISO 16140-6 auch solche Daten aufgenommen werden, die bereits in einer Untersuchung zum Maß der Inklusivität oder Exklusivität nach ISO 16140-2 [6] erhalten wurden.

Die technischen Regeln für die Durchführung der Verfahrensvergleichsuntersuchung und des Ringversuchs sind in Abschnitt 6 und Abschnitt 7 angegeben. Die folgenden 6 Fälle sind abgedeckt. Dabei wird zwischen der Bestätigung/Typisierung von *Salmonella* und der anderer Mikroorganismen unterschieden.

- Validierung von Verfahren zur Bestätigung auf Familien-Ebene (ohne *Salmonella*);
- Validierung von Verfahren zur Bestätigung auf Gattungs-Ebene (ohne *Salmonella*);
- Validierung von Verfahren zur Bestätigung auf Spezies-Ebene (ohne *Salmonella*);
- Validierung von Verfahren zur Bestätigung/Typisierung bis zur Ebene des mikrobiellen (Unter-)Typs (ohne *Salmonella*);
- Validierung von Verfahren zur Bestätigung/Typisierung von *Salmonella* bis zur Gattungs- oder Spezies-Ebene;
- Validierung von Verfahren zur Bestätigung/Typisierung von *Salmonella* bis zur Serotyp-Ebene.

5 Stämme

Die reinen Stämme für die Bestimmung der Inklusivität und der Exklusivität müssen gut gekennzeichnet sein: Daher muss die Stammkennzeichnung den Anforderungen nach ISO 7218 entsprechen. Anhand dieser Identifizierungsdaten der einzelnen Stämme kann eine (zusätzliche) Bestätigung des Ergebnisses in den Fällen erfolgen, in denen Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen des Referenzbestätigungsverfahrens und des alternativen Bestätigungsverfahrens auftreten.

6 Verfahrensvergleichsuntersuchung

6.1 Allgemeines

Die Verfahrensvergleichsuntersuchung ist der Teil des Validierungsprozesses, der nur in einem Labor durchgeführt wird. Er umfasst eine Untersuchung zum Maß der Inklusivität und Exklusivität des alternativen Verfahrens. Die Ergebnisse werden mit denen des Referenzbestätigungsverfahrens verglichen.

6.2 Auswahl der Prüfstämme

Es muss ein Spektrum von Stämmen verwendet werden. Die Kriterien für die Auswahl von Prüfstämmen sind in Anhang A angegeben. Bei der Auswahl der Stämme sollte das Messprinzip des Alternativverfahrens berücksichtigt werden (z. B. kulturbasiert, immunologisch, molekularbasiert). Verschiedene Messprinzipien können die Verwendung verschiedener Listen mit Stämmen erfordern. Es ist wichtig, verdächtige und störende Kolonien einzubeziehen, die unter Umständen auf den für das Referenzverfahren verwendeten Medien wachsen.

Die Beweggründe für die Auswahl der Stämme und ihrer Merkmale müssen im Untersuchungsbericht aufgezeichnet werden.

Jeder Stamm sollte ausreichend detailliert biochemisch, serologisch und/oder genetisch charakterisiert sein, damit seine Identität bekannt ist. Die Stämme sollten unter Berücksichtigung des Anwendungsbereichs der Validierung vorzugsweise aus Lebensmitteln, Futtermitteln, der Umgebung bei der Lebensmittelherstellung oder dem Bereich der Primärproduktion isoliert worden sein. Es können jedoch auch klinische Stämme, Umweltstämme und Stämme aus Kultursammlungen verwendet werden. Die ursprüngliche Quelle aller Stämme sollte bekannt sein, und sie müssen in einer örtlichen, nationalen oder internationalen Kultursammlung aufbewahrt werden (z. B. in einem Expertenlabor), damit sie bei Bedarf in zukünftigen Untersuchungen verwendet werden können. Hinweise zur örtlichen Instandhaltung von Stammkulturen können ISO 11133 [3] entnommen werden.

Durch spezialisierte Bezugslabore generierte Ergebnis des Referenzverfahrens können dann verwendet werden, wenn das die Validierungsuntersuchung durchführende Labor die Bestätigung/Typisierung seltener Stämme nach dem Referenzverfahren nicht durchführen kann. So ist es beispielsweise zulässig, bei der Untersuchung seltener *Salmonella*-Serotypen die Serotypisierungsergebnisse eines *Salmonellen*-Bezugslabors zu verwenden.

6.3 Untersuchung zum Maß der Inklusivität

6.3.1 Prüfung der Zielstämme

Von allen Zielstämmen müssen reine Kulturen mit dem Referenzbestätigungsverfahren und dem alternativen Bestätigungsverfahren geprüft werden. Es ist nicht erforderlich, das Referenzbestätigungsverfahren gemeinsam mit dem alternativen Bestätigungsverfahren zu wiederholen, wenn die erforderlichen Daten für das Referenzverfahren vorliegen.

Die Anzahl der unter verschiedenen Optionen zu prüfenden Stämme (siehe Abschnitte 6.3.2 bis 6.3.7) ist in den Tabellen D.1 und D.2 zusammengefasst.

6.3.2 Familien-Ebene (ohne *Salmonella*)

Zur Bestätigung der Inklusivität müssen mindestens 200 unterschiedliche Zielstämme geprüft werden.

BEISPIEL Das Alternativverfahren soll *Enterobacteriaceae* bestätigen, also muss eine Auswahl von 200 unterschiedlichen Stämmen von *Enterobacteriaceae* in die Untersuchung zum Maß der Inklusivität einbezogen werden.

6.3.3 Gattungs-Ebene (ohne *Salmonella*)

Zur Bestätigung der Inklusivität müssen mindestens 150 unterschiedliche Zielstämme geprüft werden.

BEISPIEL Das Alternativverfahren soll *Listeria* spp. bestätigen, also muss eine Auswahl von 150 unterschiedlichen Stämmen von *Listeria* spp. in die Untersuchung zum Maß der Inklusivität einbezogen werden.

6.3.4 Spezies-Ebene (ohne *Salmonella*)

Zur Bestätigung der Inklusivität müssen mindestens 100 unterschiedliche Zielstämme je Spezies geprüft werden, für die das Alternativverfahren eine Identifizierung ermöglichen soll.

BEISPIEL Das Alternativverfahren soll *L. monocytogenes* bestätigen, also muss eine Auswahl von 100 unterschiedlichen Stämmen von *L. monocytogenes* in die Untersuchung zum Maß der Inklusivität einbezogen werden.

6.3.5 Ebene des mikrobiellen (Unter-)Typs (ohne *Salmonella*)

Zur Bestätigung der Inklusivität müssen mindestens 25 unterschiedliche Zielstämme je mikrobiellem (Unter-)Typ geprüft werden, für die das Alternativverfahren eine Identifizierung ermöglichen soll. Falls die Inklusivität von mehr als 4 mikrobiellen (Unter-)Typen erforderlich ist, müssen mindestens 100 Stämme geprüft werden. Diese sollten zu gleichen Teilen über die verschiedenen zu untersuchenden mikrobiellen (Unter-)Typen verteilt werden. Dabei müssen mindestens 5 Stämme je mikrobiellem (Unter-)Typ verwendet werden.

BEISPIEL Das Alternativverfahren soll *E. coli* O157, *E. coli* O111, *E. coli* O26, *E. coli* O103 und *E. coli* O145 bestätigen. Daher müssen mindestens 20 unterschiedliche Stämme von jeder der 5 Serogruppen in der Untersuchung zum Maß der Inklusivität enthalten sein. Dabei müssen insgesamt mindestens 100 Stämme berücksichtigt werden.

In Fällen, in denen die erforderliche Anzahl von angegebenen Zielstämmen nicht zur Verfügung steht, könnte unter Berücksichtigung von Faktoren, wie der Häufigkeit des Auftretens und der öffentlichen Gesundheit oder der Bedeutung dieser genannten Stämme für das Verderben von Produkten die Anzahl der Stämme neu überdacht werden.

6.3.6 Gattungs- oder Spezies-Ebene von *Salmonella*

Zur Bestätigung der Inklusivität müssen mindestens 150 unterschiedliche Zielstämme geprüft werden.

- Falls das alternative Bestätigungsverfahren *Salmonella* spp. bestätigen soll, müssen die Zielstämme mindestens je 2 Stämme von *S. bongori*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diazrizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* und *S. enterica* subsp. *indica* enthalten, die mit Stämmen von *S. enterica* subsp. *enterica* ergänzt wurden, um die allgemeinen Serotypen abzudecken.
- Falls das alternative Bestätigungsverfahren *S. enterica* bestätigen soll, müssen die Zielstämme mindestens je 2 Stämme von *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diazrizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* und *S. enterica* subsp. *indica* enthalten, die mit Stämmen von *S. enterica* subsp. *enterica* ergänzt wurden, um die allgemeinen Serotypen abzudecken.
- Falls das alternative Bestätigungsverfahren *S. enterica* subsp. *enterica* bestätigen soll, müssen die Zielstämme unterschiedliche Stämme (und Serotypen) ausschließlich von *S. enterica* subsp. *enterica* enthalten.

6.3.7 Serotyp-Ebene von *Salmonella*

Zur Bestätigung der Inklusivität müssen mindestens 25 unterschiedliche Zielstämme je *Salmonella*-Serotyp geprüft werden, für die das Alternativverfahren eine Identifizierung ermöglichen soll. Falls mehr als 10 Serotypen erforderlich ist, müssen mindestens 250 Stämme geprüft werden. Diese sollten zu gleichen Teilen über die verschiedenen zu untersuchenden Serotypen verteilt werden. Dabei müssen mindestens 5 Stämme je Serotyp verwendet werden.

BEISPIEL Das Alternativverfahren soll *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium bestätigen. Also müssen 25 unterschiedliche Stämme von *Salmonella* Enteritidis und 25 unterschiedliche Stämme von *Salmonella* Typhimurium in die Untersuchung zum Maß der Inklusivität einbezogen werden.

6.4 Untersuchung zum Maß der Exklusivität

6.4.1 Prüfung von Nicht-Zielstämmen

Von allen Nicht-Zielstämmen müssen reine Kulturen mit dem Referenzbestätigungsverfahren und dem alternativen Bestätigungsverfahren geprüft werden. Es ist nicht erforderlich, das Referenzbestätigungsverfahren gemeinsam mit dem alternativen Bestätigungsverfahren zu wiederholen, wenn die erforderlichen Daten für das Referenzverfahren vorliegen.

Die Anzahl der unter verschiedenen Optionen zu prüfenden Stämme (siehe Abschnitte 6.4.2 bis 6.4.7) ist in den Tabellen D.1 und D.2 zusammengefasst.

Es sollten vorzugsweise Nicht-Zielstämme ausgewählt werden, die auf den im Referenzverfahren verwendeten selektiven Agarmedien wachsen können.

6.4.2 Familien-Ebene (ohne *Salmonella*)

Zur Bestätigung der Exklusivität müssen mindestens 100 unterschiedliche Nicht-Zielstämme geprüft werden.

6.4.3 Gattungs-Ebene (ohne *Salmonella*)

Zur Bestätigung der Exklusivität müssen mindestens 100 unterschiedliche Nicht-Zielstämme geprüft werden.

6.4.4 Spezies-Ebene (ohne *Salmonella*)

Zur Bestätigung der Exklusivität müssen mindestens 100 unterschiedliche Nicht-Zielstämme geprüft werden. Dabei gilt:

- 50 Stämme müssen von der Nicht-Zielgattung sein,
- 50 Stämme müssen von der Nicht-Zielspezies innerhalb der Zielgattung sein.

BEISPIEL Das Alternativverfahren soll *L. monocytogenes* bestätigen, also müssen 50 unterschiedliche Stämme außerhalb von *Listeria* spp. und 50 unterschiedliche Stämme von *Listeria* spp. aber außerhalb von *L. monocytogenes* in die Exklusivitätsuntersuchung einbezogen werden.

6.4.5 Ebene des mikrobiellen (Unter-)Typs (ohne *Salmonella*)

Zur Bestätigung der Exklusivität müssen mindestens 100 unterschiedliche Nicht-Zielstämme geprüft werden. Dabei gilt:

- wenigstens 25 Stämme müssen von der Nicht-Zielgattung sein,
- wenigstens 25 Stämme müssen vom Nicht-Ziel(-unter-)typ innerhalb der Ziel-Spezies sein,
- die restlichen Stämme bis zur Gesamtzahl von 100 Stämmen müssen unterschiedliche Nicht-Zielstämme sein.

BEISPIEL Das Alternativverfahren soll *E. coli* O157, *E. coli* O111, *E. coli* O26, *E. coli* O103 und *E. coli* O145 bestätigen. Daher müssen 25 unterschiedliche Stämme außerhalb von *E. coli* und 75 unterschiedliche Stämme von *E. coli*-Serogruppen außerhalb der 5 oben genannten Serogruppen in die Exklusivitätsuntersuchung einbezogen werden.

6.4.6 Gattungs- und Spezies-Ebene von *Salmonella*

Zur Bestätigung der Exklusivität müssen mindestens 100 unterschiedliche Nicht-Zielstämme geprüft werden.

- Falls das alternative Bestätigungsverfahren *S. enterica* bestätigen soll, zählen zumindest 2 Stämme von *S. bongori* zu den Nicht-Zielstämmen.
- Falls das alternative Bestätigungsverfahren *S. enterica* subsp. *enterica* bestätigen soll, gehören mindestens je 2 Stämme von *S. bongori*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diazriozonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* und *S. enterica* subsp. *indica* zu den Nicht-Zielstämmen.

6.4.7 Serotyp-Ebene von *Salmonella*

Zur Bestätigung der Exklusivität müssen mindestens 100 Nicht-Zielstämme geprüft werden. Dabei gilt:

- 25 Stämme müssen von der Nicht-Zielgattung sein,
- 75 Stämme müssen von der Nicht-Zielserotypen innerhalb der Zielunterspezies sein.

Falls das Alternativverfahren alle *Salmonella*-Serotypen bestätigen soll, müssen insgesamt 100 Stämme von Nicht-Zielgattungen geprüft werden.

BEISPIEL Das Alternativverfahren soll *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium bestätigen. Also müssen 25 unterschiedliche Stämme außerhalb von *Salmonella* spp. und 75 Stämme von 75 unterschiedlichen *Salmonella*-Serotypen außer *Salmonella* Enteritidis und *Salmonella* Typhimurium in die Exklusivitätsuntersuchung einbezogen werden.

6.5 Angabe und Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse für die Inklusivität (siehe Abschnitt 6.3) werden, wie in Tabelle 1 dargestellt, tabellarisch angegeben und die Auswertung nach Tabelle 2 eingefügt. Die Ergebnisse für die Exklusivität (siehe Abschnitt 6.4) werden, wie in Tabelle 3 dargestellt, tabellarisch angegeben und die Auswertung nach Tabelle 4 eingefügt. Die Ergebnisse des alternativen Bestätigungsverfahrens werden zuerst mit denen des Referenzbestätigungsverfahrens verglichen. Bei Missverhältnissen zwischen den Ergebnissen des Referenzverfahrens und der Identifizierung des betreffenden Stamms werden die Ergebnisse auch mit den Identifizierungsdaten des betreffenden Stamms verglichen. Dies ist dann die zweite und abschließende Auswertung nach Tabelle 2 oder Tabelle 4. Die Feststellungen werden entsprechend angemerkt. Alle auftretenden Missverhältnisse bei den Ergebnissen müssen vom organisierenden Labor anhand von geeigneten Identifizierungs- oder Charakterisierungsverfahren untersucht (z. B. durch DNS-Sequenzierung) und im Untersuchungsbericht vorzugsweise in tabellarischer Form mit einer Begründung erwähnt werden.

Tabelle 1 — Darstellung der Ergebnisse für die Inklusivität

Zielstamm	Eigenschaften des Stamms	Endergebnis (+/–) ^a		Auswertung der Ergebnisse nach Tabelle 2	Bemerkungen
		Referenzbestätigungsverfahren	Alternatives Bestätigungsverfahren		
1					
2					
3					
usw.					
^a +: Der Stamm wurde als Zielstamm bestätigt –: Der Stamm wurde nicht als Zielstamm bestätigt					

Tabelle 2 — Vergleich und Auswertung der Ergebnisse zwischen dem Referenz- und dem Alternativverfahren für die Untersuchung zum Maß der Inklusivität

Ergebnis des (Referenz- oder Alternativ-)Verfahrens je Stamm			Erste Auswertung	Zweite und abschließende Auswertung (sofern zutreffend)
Referenzbestätigungsverfahren	Alternatives Bestätigungsverfahren	Identifizierung des (Ziel-) Stamms	Alternatives Bestätigungsverfahren im Vergleich mit dem Referenzbestätigungsverfahren ^a	Alternatives Bestätigungsverfahren im Vergleich mit der Stammidentifizierung ^a
+	+	+	PA	Nicht anwendbar
+	–	+	ND	ND
–	+	+	PD	PA
–	–	+	NA	Nicht anwendbar
^a PA: Positive Übereinstimmung, ND: Negativabweichung, PD: Positivabweichung, NA: Negative Übereinstimmung				