

DIN EN ISO 20976-1



ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2016-10-19

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Leitfaden zur Durchführung von Challengetests bei Lebensmitteln und
Futtermitteln –
Teil 1: Challengetests zur Untersuchung von Wachstumspotential, der
Verzögerungszeit und maximaler Wachstumsrate (ISO/DIS 20976-1:2016);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 20976-1:2016**

Microbiology of the food chain –
Guidelines for conducting challenge tests of food and feed products –
Part 1: Challenge tests to study the growth potential, lag time and the maximum growth rate
(ISO/DIS 20976-1:2016);
German and English version prEN ISO 20976-1:2016

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Lignes directrices pour la réalisation des tests d'épreuve microbiologique sur les produits
alimentaires –
Partie 1: Tests de croissance pour étudier le potentiel de croissance, le temps de latence et le
taux maximal de croissance (ISO/DIS 20976-1:2016);
Version allemande et anglaise prEN ISO 20976-1:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-08-19 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 des 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 76 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20976-1:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN ISO 20976-1 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierte internationale Norm wird im Folgenden auf die entsprechende Deutsche Norm hingewiesen:

ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 6887-1	siehe DIN EN ISO 6887-1
ISO 6887-2	siehe DIN EN ISO 6887-2
ISO 6887-3	siehe DIN EN ISO 6887-3
ISO 6887-4	siehe DIN EN ISO 6887-4
ISO 6887-5	siehe DIN EN ISO 6887-5
ISO 6887-6	siehe DIN EN ISO 6887-6
ISO/IEC 17025	siehe DIN EN ISO/IEC 17025
ISO/TS 19036	siehe DIN ISO/TS 19036
ISO 3534-1	siehe DIN ISO 3534-1

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

ISO 6887-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 1: Allgemeine Regeln für die Herstellung von Erstverdünnungen und Dezimalverdünnungen*

ISO 6887-2, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 2: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Fleisch und Fleischerzeugnissen*

ISO 6887-3, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 3: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Fisch und Fischerzeugnissen*

ISO 6887-4, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 4: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von sonstigen Erzeugnissen*

ISO 6887-5, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 5: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Milch und Milcherzeugnis*

ISO 6887-6, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen — Teil 6: Spezifische Regeln für die Vorbereitung von Proben aus der Primärproduktion*

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

ISO/TS 19036, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Anleitung zur Feststellung von Messunsicherheiten bei quantitativen Bestimmungen*

ISO 3534-1, *Statistik — Begriffe und Formelzeichen — Teil 1: Wahrscheinlichkeit und allgemeine statistische Begriffe*

— Leerzeichen —

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Leitfaden zur Durchführung von
Challengetests bei Lebensmitteln und Futtermitteln — Teil 1: Challengetests
zur Untersuchung von Wachstumspotential, der Verzögerungszeit und
maximaler Wachstumsrate (ISO/DIS 20976-1:2016)**

*Microbiologie de la chaîne alimentaire — Lignes directrices pour la réalisation des tests d'épreuve microbiologique
sur les produits alimentaires — Partie 1 : Tests de croissance pour étudier le potentiel de croissance, le temps de
latence et le taux maximal de croissance (ISO/DIS 20976-1:2016)*

*Microbiology of the food chain — Guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 1:
Challenge tests to study the growth potential, lag time and the maximum growth rate (ISO/DIS 20976-1:2016)*

ICS:

Deskriptoren:

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

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	10
4.1 Schätzung der Verzögerungszeit	11
4.2 Schätzung der maximalen Wachstumsrate	12
4.3 Schätzung des Wachstumspotenzials	12
5 Geräte	13
6 Untersuchungsdesign und Probenahme	13
6.1 Chargenanzahl und Auswahlkriterien	13
6.2 Vorbereitung der Prüfeinheiten	14
6.3 Anzahl der zu beimpfenden Prüfeinheiten	14
7 Auswahl der Stämme	15
8 Herstellung des Inokulums	15
8.1 Herstellung der vegetativen Zellsuspensionen	15
8.2 Herstellung der Sporenlösungen	16
9 Beimpfung der Prüfeinheiten	16
10 Kontrollprüfungen	17
10.1 Kontrollen der zu untersuchenden Lebensmittel	17
10.2 Vorbereitung der Kontroll-Prüfeinheiten	17
11 Lagerung der Prüfeinheiten	18
12 Analyse der Prüfeinheiten	18
13 Auswertung der Ergebnisse	19
13.1 Schätzung des Wachstumspotenzials (δ)	19
13.2 Schätzung der Wachstumsrate ($\mu_{\max}$)	19
13.3 Schätzung der Verzögerungszeit (λ)	20
14 Prüfbericht	20
14.1 Ziel der Studie und Art des Challenge-Tests	20
14.2 Versuchsverfahrensanweisung	21
14.3 Analyse der Proben	21
14.4 Ergebnisse	22
14.5 Schlussfolgerungen	22
14.6 Referenzdokumente	22
Anhang A (informativ) Charakterisierung der Auswirkungen der Inter-Chargen-Variabilität von physikalisch-chemischen Parametern auf das Bakterienwachstum	23

Anhang B (informativ) Entscheidungshilfe zur Berechnung der minimalen Anzahl von herzustellenden Prüfeinheiten für den Challenge-Test.....	26
Anhang C (informativ) Beispiel für Verfahrensanweisungen zur Herstellung des Inokulums.....	29
Anhang D (informativ) Beispielanwendungen von Challenge-Tests zur Schätzung der maximalen Wachstumsrate, Verzögerungszeit und Wachstumspotenzial.....	32
Anhang E (informativ) Interpretation der Ergebnisse zum Wachstumspotenzial.....	36
Literaturverzeichnis.....	37

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20976-1:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 20976-1:2016 wurde vom CEN als prEN ISO 20976-1:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen 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. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien 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 empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*.

Einleitung

Unter den allgemeinen Grundsätzen des Codex Alimentarius zur Lebensmittelhygiene obliegt es den Lebensmittelunternehmen, mikrobiologische Gefährdungen zu kontrollieren und mikrobielle Risiken zu verwalten. Deshalb müssen diese die validierten Kontrollmaßnahmen innerhalb des Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP)-Systems ergreifen und Studien durchführen, um die Einhaltung der Kriterien für Lebensmittelsicherheit in der gesamten Lebensmittelkette zu untersuchen.

Im Rahmen der mikrobiellen Risikobewertung (MRA, en: Microbial Risk Assessment) wurden mehrere komplementäre Ansätze entwickelt, um die Lebensmittelsicherheit und Risiken für die Lebensmittelqualität durch Pathogene oder Verderb fördernde Mikroorganismen in der Lebensmittelkette abzuschätzen. Die MRA wird von den Aufsichtsbehörden unter der Schirmherrschaft der internationalen Agentur für die Erstellung von Lebensmittelstandards [8] angenommen. Challenge-Tests sind eine der verfügbaren und anerkannten Ansätze, die zur Validierung von Kontrollmaßnahmen innerhalb des HACCP-Systems, sowie zur Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit und Qualität von Lebensmittelprodukten, von Prozessen der Lebensmittelproduktion, Bedingungen der Lagerung von Lebensmitteln und Empfehlungen für die Zubereitung von Lebensmitteln für Konsumenten genutzt werden.

Daher stellt diese Norm technische Regeln, Berechnungen und Herangehensweisen für die Untersuchung der Fähigkeit von eingepfropften Mikroorganismen in Ausgangsstoffen, Zwischen- oder Endprodukten zu wachsen, zu überleben oder inaktiviert zu werden, unter verschiedenen, angemessen vorhersehbaren Bedingungen, für Lebensmittelprozesse, Lagerung und Verbrauch, auf. Die Versuchsanordnung und die Auswahl der Untersuchungsbedingungen müssen im Einklang mit den Zielsetzungen und dem Anwendungsbereich der Untersuchung begründet werden. Regulierungsbehörden können leicht unterschiedliche Empfehlungen haben und diese Unterschiede wurden so weit wie möglich berücksichtigt. Es ist jedoch möglich, dass einige spezifische Anforderungen integriert werden dürfen, um eine behördliche Anerkennung des Challenge-Tests zu erhalten.

Da sich die Kinetiken für Wachstum und Inaktivierung deutlich unterscheiden, besteht diese ISO-Norm aus zwei Teilen, unter dem allgemeinen Titel *Microbiology of the food chain — Guidelines for conducting challenge-test*:

- *Part 1: Challenge-tests to study the growth potential, lag time and the maximum growth rate;*
- *Part 2: Challenge-tests to study the survival and inactivation.*

Die Verwendung dieser Norm ISO 20976 erfordert Fachwissen in relevanten Bereichen wie Lebensmittelmikrobiologie, Lebensmittelwissenschaften, Lebensmittelverarbeitung und Statistik. Die statistischen Kenntnisse umfassen ein Verständnis über die Theorie der Probenahme, Versuchsdesigns, statistische Analyse von mikrobiologischen Daten und statistische Konzepte im Überblick, die in prädiktiver Modellierung verwendet werden. Das Gamma-Konzept eignet sich besonders für weitere Simulationen mit den Daten aus dem Challenge-Test, z. B. um das Wachstum bei anderen als den geprüften Lagertemperaturen zu beurteilen, oder um die Entwicklung besserer Zusammensetzungen und Lagerungsbedingungen zu unterstützen, mit denen die mikrobielle Qualität und/oder Sicherheit der untersuchten Lebensmittel verbessert werden. Wenn diese Norm ISO 20976 überarbeitet wird, werden alle verfügbaren Informationen berücksichtigt, um die Robustheit des entwickelten Konzepts als Teil des globalen MRA zu verbessern.

Aus praktischen Gründen umfasst der Begriff Lebensmittel auch Futtermittel.

Die Verwendung dieser Internationalen Norm könnte auf Hefen, die kein Myzel bilden, erweitert werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm legt die Verfahrensanweisungen für die Durchführung von mikrobiologischen Challenge-Tests für Wachstumsstudien bei vegetativen und sporenbildenden Bakterien in Ausgangsstoffen, Zwischen- und Endprodukten fest.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokumentes erforderlich. 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 6887-1, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*

ISO 6887-2, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products*

ISO 6887-3, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products*

ISO 6887-4, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products*

ISO 6887-5, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products*

ISO 6887-6, *Microbiology of food and animal feed — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage*

ISO/IEC 17025, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*

ISO 18787, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Determination of water activity*

ISO/TS 19036, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokumentes gelten die folgenden Begriffe und Definitionen.

3.1.

Bakterienspore

resistente Form von Bakterien, die bis zur Keimung im Ruhezustand verbleibt

3.2

Charge

Gruppe oder Zusammenstellung identifizierbarer Lebensmittel, die unter praktisch gleichen Bedingungen in einem bestimmten Prozess, an einem gegebenen Ort und innerhalb einer definierten Produktionszeit gewonnen werden

[QUELLE: Diese Definition stammt aus der UE-Verordnung Nr. 2073/2005 zu mikrobiologischen Kriterien]

3.3

Grundwert

minimale, optimale und maximale Werte von physikalisch-chemischen Faktoren (zum Beispiel Temperatur, pH-Wert, a_w), die das Wachstum eines bestimmten Bakterienstamms charakterisieren

3.4

Challenge-Test

Studie über die Entwicklung einer Bakterienpopulation, mit der ein Lebensmittel künstlich beimpft wurde (für den Text bedenken)

3.5

experimenteller Datenpunkt

Ergebnis der Untersuchung einer Testeinheit je Gewichtseinheit, je Volumeneinheit oder je Flächeneinheit

3.6

exponentielle Wachstumsphase

Phase, in der die Bakterienzellen exponentiell zunehmen

3.7

Generationszeit

(T_g)

Zeit, die die Bakterienpopulation zur Verdopplung ihrer Zellzahl benötigt

3.8

Keimung

Vorgang der Umwandlung einer bakteriellen Spore in eine vegetative Zelle

3.9

Wachstums- oder Inaktivierungspotenzial

(δ)

Differenz zwischen der Konzentration ($\log_{10}$) der künstlich inokulierten Bakterienpopulation am definierten Ende eines Challenge-Tests und dem der ursprünglichen Konzentration ($\log_{10}$) (siehe Anhang A)

3.10

maximale Wachstumsrate

(μ_{max})

Steigung der Kurve, die die Entwicklung des natürlichen Logarithmus der Population nach Zeit während der exponentiellen Phase anzeigt

3.11

lag-Phase

Phase, in der sich die Bakterienpopulation ohne Wachstum an die Umweltbedingungen anpasst, bevor die Bakterien in die exponentielle Phase eintreten

3.12

Verzögerungszeit

(λ)

kinetischer Parameter zur Charakterisierung der lag-Phase in Zeiteinheiten

3.13

Auswuchs

umfasst Phänomene wie Kernteilung, Zellwandsynthese, Zelldehnung und erste Zellteilung einer Bakterienzelle nach der Keimung der Bakterienspore

3.14

organisierendes Laboratorium

verantwortliches Laboratorium für die Durchführung der Challenge-Tests

3.15

Probenahme

Auswahl einer oder mehreren Einheiten oder Portionen von Lebensmitteln, die repräsentativ für dieses Lebensmittel sind

3.16

Probenahmepunkt

(Auszählungsdatum)

ausgewählter Zeitpunkt für die Sammlung von Daten während der Studie

3.17

Sporenbildung

Mechanismus, bei dem vegetative Zellformen Sporen bilden

3.18

stationäre Phase

Phase, in der die Bakterienpopulation ihr maximales Niveau erreicht

3.19

Überleben

Zustand, in dem sich Zellen entweder vermehren oder nur sehr langsam abnehmen

3.20

Einwaage

aus der Prüfeinheit zur Analyse entnommene, abgemessene repräsentative Probe (Volumen oder Masse)

[QUELLE: Übernommen von ISO/DIS 6887-1, 3.5]

3.21

Prüfeinheit

abgemessene (Volumen oder Masse) Menge Lebensmittel, die beimpft werden soll

3.22

vegetative Zelle

Bakterienform, die in der Lage ist, unter günstigen Umweltbedingungen zu wachsen

3.23

Wasseraktivität (a_w)

Verhältnis des Wasserdampfdrucks im Lebensmittel zum Dampfdruck von reinem Wasser bei derselben Temperatur

$$a_w = \frac{c_{EM}}{100} = \frac{p_F(T)}{p_S(T)}$$

wobei

c_{EM}	der in Kontakt mit dem Lebensmittel stehende äquilibrierte relative Wassergehalt der Atmosphäre in Kontakt mit dem Lebensmittel ist;
$p_F(T)$	der mit dem Lebensmittel äquilibrierte partielle Wasserdampfdruck bei der Temperatur T (konstant gehalten während der Messung) ist;
$p_S(T)$	der gesättigte partielle Druck von reinem Wasser bei gleicher Temperatur (T) ist; dieser kann aus Wasserdampfdruck-Referenztabellen bezogen werden.

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Wasseraktivität ist daher eine dimensionslose Größe, wobei eine vollständig wasserfreie Testprobe eine Wasseraktivität von 0,0 und reines salzfreies Wasser einen Wert von 1,0 hat. Die Wasseraktivitäten der meisten Lebensmittel befinden sich am oberen Ende dieser Skala und reichen von etwa 0,992 für unbehandeltes, rohes Fleisch bis etwa 0,800 für gesalzene und getrocknete Produkte.

4 Kurzbeschreibung

Das organisierende Laboratorium muss über Kenntnisse und Fähigkeiten in Lebensmittelmikrobiologie, Lebensmittelwissenschaften und -technologie sowie in Statistik für die Entwicklung und Durchführung der Untersuchung, die Interpretation der Ergebnisse und das Ziehen von Schlussfolgerungen verfügen. Die Untersuchungen müssen im Rahmen eines Qualitätssicherungssystems durchgeführt werden (z. B. nach ISO/IEC 17025).

Für Teil 1 der ISO-Norm zielen Challenge-Tests darauf ab, das Wachstumspotenzial, die Verzögerungszeit und die maximale Wachstumsrate zu untersuchen, um beispielsweise die Haltbarkeit des Produkts als Kontrollmaßnahme zu bestimmen oder die mikrobielle Stabilität eines Lebensmittels zu bewerten.

Das Verhalten einer Bakterienpopulation in einem Lebensmittel, d. h. die bakterielle Wachstumskinetik, ist abhängig von den Eigenschaften des Lebensmittels (zum Beispiel: a_w , pH-Wert, Konzentration von Konservierungsstoffen usw.), dem physiologischen Zustand der Bakterien, den Lagerbedingungen des Lebensmittels (Temperatur, Verpackungsformat und Gaszusammensetzung), den Herstellungsprozessen und den Interaktionen mit der natürlichen Mikroflora.

Die bakterielle Wachstumskinetik wird durch drei Hauptphasen definiert (siehe Bild 1):

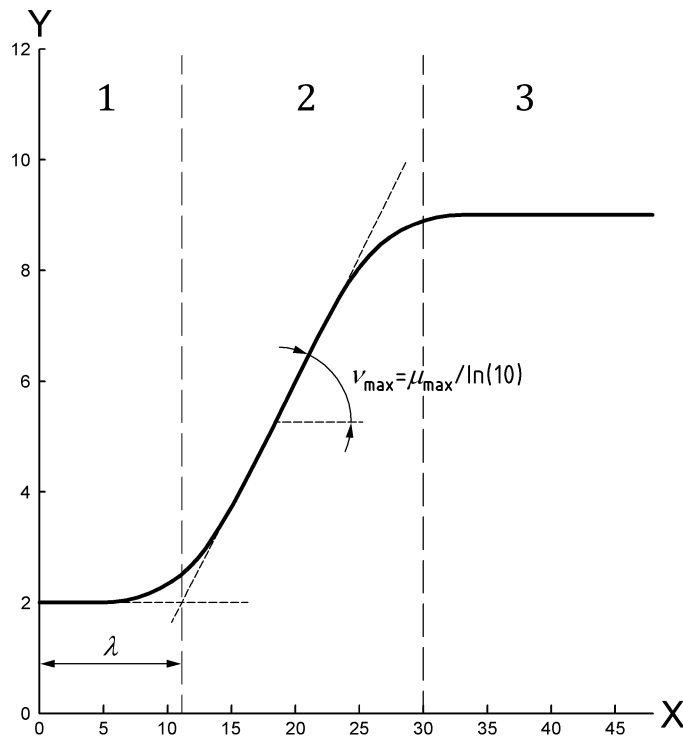
- lag-Phase: Die Dauer der lag-Phase wird durch die Verzögerungszeit (gekennzeichnet mit λ) charakterisiert, die mit Hilfe des Schnittpunkts zwischen der Linie der exponentiellen Wachstumsphase (gezeichnet in halblogarithmischen Koordinaten) und der horizontalen Linie, die durch die Anfangszellkonzentration verläuft, geschätzt wird. Für sporenbildende Bakterien umfasst die Verzögerungszeit die Sporenkeimung und den Auswuchs;
- exponentielle Wachstumsphase: Diese Phase ist durch die maximale Wachstumsrate (gekennzeichnet mit μ_{max}) charakterisiert, die dem maximalen Anstieg des natürlichen Logarithmus der Zellzahl je Zeiteinheit entspricht. Die Beziehung zwischen der Generationszeit (geschrieben T_g) und μ_{max} ist durch die folgende Gleichung gegeben:

$$\mu_{max} = \ln(2)/T_g$$

Die Steigung der Kurve, die den $\log_{10}$ der Bakterienpopulation gegen die Zeit zeigt, ist mit v_{max} gekennzeichnet und deren Beziehung zur maximalen Wachstumsrate wird durch folgende Gleichung angegeben:

$$\mu_{\max} = v_{\max} \cdot \ln(10)$$

c) stationäre Phase: Phase, in der die Bakterienpopulation auf ihrem maximalen Niveau liegt.



Legende

Y $\text{Log}_{10}(\text{CFU/g})$

X Zeit

1 Lag-Phase

2 Exponentielle Wachstumsphase

3 Stationäre Phase

Bild 1 — Bakterielle Wachstumskinetik mit den drei Hauptphasen

Eine Modellanpassung wird empfohlen, um die maximale Wachstumsrate (siehe Unterabschnitt 13.2) und Verzögerungszeit (siehe Unterabschnitt 13.3) zu schätzen.

4.1 Schätzung der Verzögerungszeit

Die Verzögerungszeit ist abhängig von den Lebensmitteleigenschaften (z. B. physikalisch-chemische und mikrobiologische) und den Lagerbedingungen (z. B. Temperatur, relative Luftfeuchte, Gaszusammensetzung). Des Weiteren ist die Verzögerungszeit, im Gegensatz zur Wachstumsrate, vom physiologischen Zustand der Bakterien, die das Lebensmittel kontaminieren, und jedem Stress, dem diese Zellen oder Sporen ausgesetzt waren, abhängig.

Die Bedingungen, unter denen das Inokulum herzustellen ist, müssen so gewählt werden, dass die bei natürlicher Kontamination von Lebensmitteln induzierten Schädigungen der bakteriellen Zelle oder Spore

oder umgekehrt, die Erscheinungen die induzierte adaptive Antworten auf die Wachstumsbedingungen hervorrufen, abgebildet werden, um das natürliche bakterielle Verhalten im Produkt zu imitieren.

Die Ausgangskonzentration des Inokulums kann auch die Verzögerungszeit beeinflussen, da die Variabilität der Verzögerungszeit individueller Zellen zur Variabilität in der Verzögerungszeit der Bakterienpopulation führen kann, wenn die anfängliche Konzentration sehr gering ist (weniger als 10 Zellen je Einwaage). Der Versuchsaufbau muss genügend experimentelle Datenpunkte (mindestens drei Probenahmepunkte), die in der lag-Phase verfügbar sind, umfassen, um eine verlässliche Schätzung der Verzögerungszeit zu erhalten (siehe Abschnitt 13).

Es wird empfohlen, die Verzögerungszeit durch die Anpassung eines anerkannten und allgemein akzeptierten primären Modells zu schätzen, das für die Beschreibung des Bakterienwachstums verwendet wird. Der Standardfehler für die Schätzung der Wachstumsrate muss angegeben werden, um die Genauigkeit der Schätzung bewerten zu können. Werkzeuge für diesen Zweck sind online erhältlich (z. B. DMFit von ComBase, Growth Curve Fitting von Sym'Previus usw.).

4.2 Schätzung der maximalen Wachstumsrate

Die Lebensmitteleigenschaften (z. B. physikalisch-chemische und mikrobiologische) und die Lagerungsbedingungen (z. B. Temperatur, relative Luftfeuchte, Gaszusammensetzung) können die bakteriellen Wachstumsraten erheblich beeinflussen. Die Wachstumsrate der Bakterienpopulation wird von der Ausgangskonzentration und den physiologischen Zuständen nicht beeinflusst.

Es ist wichtig, genügend experimentelle Datenpunkte (mindestens 5 Probenahmepunkte) in der exponentiellen Wachstumsphase zur Verfügung zu haben, um eine verlässliche Schätzung der maximalen Wachstumsrate zu erhalten (siehe Abschnitt 13). Es wird empfohlen, die maximale Wachstumsrate durch die Anpassung eines anerkannten und allgemein akzeptierten primären Modells zu schätzen, das für die Beschreibung des Bakterienwachstums verwendet wird, usw. Der Standardfehler für die Schätzung der Wachstumsrate muss angegeben werden, um die Genauigkeit der Schätzung bewerten zu können. Werkzeuge für diesen Zweck sind online erhältlich (z. B. DMFit von ComBase, Growth Curve Fitting von Sym'Previus).

Maximale Wachstumsraten können entweder für eine direkte Berechnung des Anstiegs der Bakterienzahl unter den Bedingungen des Challenge-Tests und/oder als Eingaben in prädiktive Wachstumsmodelle verwendet werden.

4.3 Schätzung des Wachstumspotenzials

Die Lebensmitteleigenschaften (z. B. physikalisch-chemische und mikrobiologische) und die Lagerbedingungen (z. B. Temperatur, relative Luftfeuchte, Gaszusammensetzung) können das bakterielle Wachstumspotenzial erheblich beeinflussen.

Die Bedingungen, unter denen das Inokulum herzustellen ist, müssen so gewählt werden, dass die bei natürlicher Kontamination von Lebensmitteln induzierten Schädigungen der bakteriellen Zelle oder Spore oder umgekehrt, die Erscheinungen die induzierte adaptive Antworten auf die Wachstumsbedingungen hervorrufen, abgebildet werden, um das bakterielle Verhalten unter natürlichen Bedingungen zu imitieren.

Diese Art von Test ist dafür ausgelegt, Unterschiede in der Bakterienpopulation zu Beginn und am Ende des Challenge-Tests zu bestimmen. Diese Tests können verwendet werden, um zu bestimmen, ob ein signifikantes Bakterienwachstum in einem Lebensmittel vorliegt und um den Anstieg der Bakterienzellpopulation unter gegebenen Lagerungsbedingungen zu quantifizieren.

Es ist wichtig, genügend experimentelle Datenpunkte (mindestens 5 Probenahmepunkte) zur Verfügung zu haben, um eine verlässliche Schätzung des Wachstumspotenzials zu erhalten (siehe Abschnitt 13).

Das Wachstumspotenzial gibt keine Auskunft über die Länge der lag-Phase, den Wert der Wachstumsrate oder das maximale Niveau der stationären Phase. Das macht es schwierig, die Ergebnisse für andere Bedingungen zu extrapolieren.

5 Geräte

Es ist eine mikrobiologische Standard-Laborausrüstung erforderlich (siehe ISO 7218). Für die Vorbereitung der Einwaagen, deren angemessenen Lagerung oder zur Überwachung der Änderungen der Eigenschaften während des Challenge-Tests kann auch spezielle Laborausrüstung nötig sein.

5.1 Vorrichtung zum Verpacken der Proben in Luft, unter Vakuum oder in einer modifizierten Atmosphäre (Schutzatmosphäre).

5.2 Kühlinkubator, geeignet, Solltemperaturen von ± 1 °C zu erreichen und zu halten.

5.3 Klima-Kammer, geeignet, Solltemperaturen von ± 1 °C zu erreichen und zu halten und die relative Luftfeuchte auf ± 10 % einstellen zu können.

5.4 pH-Messgerät, geeignet, Messungen mit einer Toleranz von $\pm 0,1$ pH-Einheiten durchzuführen, pH-Messgeräte müssen Messungen mit einer Auflösung von 0,01 pH-Einheiten ausführen können.

5.5 a_w -Messgerät, das eine Wiederholgrenze aufweist, die einer Standardabweichung von $\leq 0,002$ für den a_w -Bereich 0,800-0,999 entsprechen muss (siehe ISO 18787).

5.6 Headspace-Gas-Analysator: zur Messung der Gaszusammensetzung (z. B. O₂, CO₂).

5.7 Logger zur Messung der Temperatur während der Lagerung der Prüfeinheit.

5.8 Logger zur Messung der relativen Luftfeuchte während der Lagerung der Prüfeinheit.

6 Untersuchungsdesign und Probenahme

6.1 Chargenanzahl und Auswahlkriterien

Die Anzahl der in der Untersuchung aufzunehmenden Chargen hängt von der Vergleichspräzision der Lebensmittelverarbeitungslinie ab, besonders bezüglich der physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Eigenschaften der Lebensmittelmatrix. Sie hängt auch von dem benötigten Konfidenzgrad für die Schätzung der Variabilität der Wachstumsparameter ab. Folglich ist die Erarbeitung einer allgemeingültigen Regel für die Bestimmung der Anzahl der Chargen für die Untersuchung nicht realistisch. Die Durchführung eines Challenge-Tests mit einer einzelnen Charge erlaubt nur eine Schätzung des bakteriellen Verhaltens für den gleichen Satz von Lebensmitteleigenschaften wie in der untersuchten Charge.

Wenn die Inter-Chargen-Variabilität der intrinsischen Eigenschaften von Lebensmitteln ausreichend ist, um ein signifikant unterschiedliches bakterielles Wachstumsverhalten zu induzieren, ist es notwendig, mehrere Chargen zu untersuchen, um die Variabilität innerhalb des bakteriellen Verhaltens zu bewerten. Die Anzahl der Chargen hängt also von dem Grad der erwarteten Konfidenz für die Schätzung der Variabilität der Wachstumsparameter ab. Im Allgemeinen wird empfohlen, mindestens drei Chargen auszuwählen. Es ist erforderlich, Chargen auszuwählen, die repräsentativ für die intrinsische Variabilität der getesteten Lebensmittelmatrix sind.

Die Verwendung einer einzigen Charge muss klar begründet werden. Wenn die Variabilität der intrinsischen Eigenschaften von Lebensmitteln beispielsweise zwischen verschiedenen Chargen wenig Einfluss auf das bakterielle Verhalten hat, kann mit der Durchführung von Challenge-Tests mit einer einzigen Charge das bakterielle Verhalten in dem Lebensmittelprodukt unabhängig von der verwendeten Charge abgeschätzt

werden. Eine einzelne Charge kann untersucht werden, wenn die Inter-Chargen-Variabilität der intrinsischen Eigenschaften bereits charakterisiert wurde (pH-Wert, a_w und Konzentrationen von Konservierungsstoffen usw.). In solchen Fällen wird eine Charge verwendet, die am günstigsten für das Wachstum der untersuchten Mikroorganismen ist (d. h. im schlimmsten Fall mit den höchsten pH- und a_w -Werten und mit geringer Konzentration von Konservierungsstoffen usw.).

ANMERKUNG Die Prüfung von nur einer Charge wird hauptsächlich in Challenge-Tests mit homogenen Matrizen angewandt. Es wird empfohlen, mehrere Chargen für multi-phasische (z. B. Schweinszunge in Aspik) und zusammengesetzte Lebensmittel-Matrizen (z. B. Sandwich) zu prüfen.

Anhang A enthält ein entsprechendes Kalkulationsschema zur Bewertung der Auswirkungen der Inter-Chargen-Variabilität der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Lebensmittels auf das Verhalten der untersuchten Bakterien.

6.2 Vorbereitung der Prüfeinheiten

Repräsentative Lebensmittelmatrix-Prüfeinheiten können folgende sein:

- der gesamte Inhalt der Verbraucher-Verpackungseinheiten;
- aseptisch beprobte Mengen aus den Verbraucher-Verpackungseinheiten oder aus losen Schüttungen des Lebensmittels.

Die Zusammensetzung der Prüfeinheiten muss repräsentativ für die Verbraucher-Verpackungseinheit sein (z. B. das Verhältnis und die Struktur der Prüfeinheit sind besonders relevant beim Umgang mit einem zusammengesetzten Lebensmittel) und muss frisch hergestellt worden sein. Die Prüfeinheiten müssen des Weiteren auf die gleiche Weise verpackt sein wie die Verbraucher-Verpackungseinheiten (z. B. Vakuum oder unter einer modifizierten Atmosphäre) und es wird empfohlen, das gleiche Verpackungsmaterial und ein vergleichbares Lebensmittel-Leerraum-Verhältnis zu verwenden.

Wenn es beispielsweise aus praktischen Gründen nicht möglich ist, die originale Lebensmittel-Verpackung – oder Verpackungsmaterial – zu verwenden, muss die Verwendung von alternativen Verpackungsmaterialien begründet werden. Das alternative Verpackungsmaterial muss die gleichen technischen Eigenschaften (z. B. Gasdurchlässigkeit) wie das Original haben.

Die für die Beimpfung mit Bakterien sowie für die Qualitätskontrolle verwendete Anzahl an Prüfeinheiten wird vorbereitet (siehe Abschnitt 10).

Die Prüfeinheiten müssen vor der Beimpfung bei angemessener Lagertemperatur aufbewahrt werden.

Nach Möglichkeit sollte die gesamte Prüfeinheit zur Untersuchung verwendet werden.

6.3 Anzahl der zu beimpfenden Prüfeinheiten

Die Anzahl der zu beimpfenden Prüfeinheiten je Probenahmepunkt hängt ab von:

- der Intra-Chargen-Variabilität in Bezug auf die physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Eigenschaften;
- der Variabilität bei der experimentellen Beimpfung der Prüfeinheiten.

Die Quellen der Variabilität bei experimentellen Beimpfungen sind im Wesentlichen die Art und Struktur der Lebensmittelmatrix sowie das verwendete Beimpfungsverfahren.

Es wird empfohlen, mindestens drei Prüfeinheiten je Charge und je Probenahmepunkt zu testen, um das Wachstumspotenzial, die Verzögerungszeit und die Wachstumsrate zu bestimmen (siehe

Unterabschnitt 13.1). Wenn mehr als drei Chargen verwendet werden oder wenn ausreichende Datenpunkte vorhanden sind, um eine typische Kurve zur Bestimmung der Verzögerungszeit und der Wachstumsrate zu erhalten (in der Regel acht bis zehn Datenpunkte als Minimum, siehe 13.2 und 13.3), dann ist es möglich, eine Prüfeinheit je Charge und Probenahmepunkt zu untersuchen.

Anhang B zeigt einen Entscheidungsbaum für die Berechnung der Mindestanzahl von Prüfeinheiten, die für die Beimpfung vorbereitet werden sollten, abhängig von der erwarteten Inter-Chargen-Variabilität, der Art des Challenge-Tests und der minimalen Anzahl von Datenpunkten.

Es wird empfohlen, zusätzliche Prüfeinheiten vorzubereiten, um Pannen abzudecken.

Siehe Abschnitt 10 für die für Kontrolltests vorzubereitende Anzahl der Prüfeinheiten.

7 Auswahl der Stämme

Jeder verwendete Stamm muss biochemisch und/oder serologisch und/oder genetisch ausreichend detailliert charakterisiert werden, um seine Identität bekannt zu machen. Stämme, die zuvor aus der Lebensmittelmatrix oder aus klinischen/Lebensmittel-/Umweltproben nach Ausbrüchen unter Bezug auf Lebensmittel isoliert wurden, werden gegenüber Stämmen aus Kultursammlungen bevorzugt. Die ursprüngliche Quelle aller Isolate sollte bekannt sein und diese sollten in einer lokalen (z. B. Laboratorium, das den Challenge-Test durchführt), nationalen oder internationalen Stammsammlungen aufbewahrt werden, so dass sie falls nötig auch in Zukunft verwendet werden können.

Nach Möglichkeit sollten Stämme verwendet werden, deren Grundwerte bestimmt wurden (z. B. Temperatur, pH-Wert, a_w , minimale inhibitorische Konzentration von Konservierungsstoffen usw.), um sicherzustellen, dass der ausgewählte Stamm/die ausgewählten Stämme für den Zweck geeignet ist/sind und um weitere prädiktive Modellierungen mit dem γ -Konzept zu ermöglichen.

Die Wachstumsfähigkeit der Stämme sollte vor dem Challenge-Test durch historische oder veröffentlichte Daten oder durch wie in 8.1 und 8.2 beschriebene Tests bewiesen worden sein.

Um das Wachstumspotenzial zu schätzen, wird gewöhnlich empfohlen, eine Mischung aus Stämmen der gleichen Bakterienarten zu verwenden, um Variationen des Wachstums zwischen den Stämmen einzubeziehen.

8 Herstellung des Inokulums

8.1 Herstellung der vegetativen Zellsuspensionen

Zwei aufeinanderfolgende Kulturen der/des ausgewählten Stämme/Stamms sollten wie folgt behandelt werden:

- erstens in einem Nährmedium unter Bedingungen, die ein optimales Wachstum des/der ausgewählten Stamms/Stämme ermöglichen, um das Ende der exponentiellen Phase oder die frühe stationäre Phase zu erreichen und den physiologischen Zustand der Bakterienpopulation zu standardisieren; und
- zweitens in einem Nährmedium, das die natürlichen Gegebenheiten imitiert (mindestens Temperatur und wenn relevant pH-Wert und/oder a_w), um die Stämme/den Stamm zu adaptieren und die lag-Phase zu verkürzen, nachdem die Beimpfung des Lebensmittels erfolgt ist (d. h. im schlimmsten Fall). Die Kultur wird inkubiert, bis das Ende der exponentiellen Phase oder die frühe stationäre Wachstumsphase erreicht wird.

In einigen Fällen könnte das Inokulum Stressbedingungen ausgesetzt werden, um die Prozesse der Lebensmittelproduktion zu imitieren (siehe Anhang C).

ANMERKUNG Wenn nur die maximale Wachstumsrate bestimmt wird, gibt es keine Notwendigkeit für Anpassung und Stressexposition.

Verdünnungsreihen dieser zweiten Kultur müssen in physiologischer Kochsalzlösung (angepasst an die Temperatur der zweiten Kultur) erfolgen, um die Zugabe von Nährstoffen während der Beimpfung der Prüfeinheiten zu vermeiden. Falls relevant, wird die physiologische Kochsalzlösung an die Bedingungen des zweiten Nährmediums angepasst, um den physiologischen Zustand des Inokulums beizubehalten.

Die Prüfeinheiten werden sofort beimpft.

Wenn eine Mischung der Stämme verwendet wird, sollten diese Stämme vorzugsweise in äquivalenten Konzentrationen gemischt werden.

Die Konzentration des Inokulums muss nach Auszählung auf dem gleichen Medium, das für den Challenge-Test verwendet wird, bestimmt werden. Diese Konzentration muss angepasst werden, um den in Abschnitt 9 beschriebenen Bedingungen zu entsprechen.

8.2 Herstellung der Sporenlösungen

Eine Bakterienkultur sollte unter geeigneten Bedingungen (Medium, pH-Wert und Temperatur) gezüchtet werden, um das Ende der exponentiellen Phase oder die frühe stationäre Phase zu erhalten.

Aus dem/den ausgewachsenen Stamm/Stämmen werden Subkulturen angelegt, um eine hohe Sporenbildungsrate (aerob/anaerob, Medium, Temperatur) zu erreichen. Die Länge dieses Schrittes variiert (von Tagen bis Wochen), abhängig von der Bakterienart und den Bedingungen der Sporenbildung. Die Sporenbildungsrate muss vor dem Einsammeln der Sporen mit einem Mikroskop überprüft werden.

Die Konzentration des Sporeninokulums wird durch Auszählung auf dem gleichen Medium, das für den Challenge-Test verwendet wird, nach angemessener Hitzebehandlung^[7] bestimmt. Diese Konzentration muss angepasst werden, um den in Abschnitt 9 beschriebenen Bedingungen zu entsprechen.

Ein Beispiel für eine Verfahrensanweisung zur Produktion von Sporen wird in Anhang C gegeben.

9 Beimpfung der Prüfeinheiten

Das Beimpfungsverfahren zielt darauf ab, stets die gleiche Konzentration an Bakterien je Prüfeinheit zu erhalten und darf die physikalisch-chemischen Eigenschaften (einschließlich pH-Wert und a_w) des Lebensmittels nicht verändern. Um dies zu erreichen, kann es notwendig sein, den pH-Wert und a_w des Inokulums einzustellen. Es wird empfohlen, das Verhältnis von Inokulum-Volumen zu Probenmasse (oder Volumen) von 1:100 nicht zu überschreiten.

Der Beimpfungsgrad muss basierend auf dem untersuchten Lebensmittel und Bakterien ausgewählt und begründet werden und er muss zu der für die Auszählung verwendeten Methode passen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu verbessern. Wenn die anfängliche Konzentration des Inokulums niedrig ist, kann die Bestimmungsgrenze, zum Beispiel durch Erhöhung der Anzahl auszählender Platten, gesenkt werden (siehe Abschnitt 13). Es wird empfohlen, eine Beimpfungskonzentration zu verwenden, die mindestens das Fünffache der Bestimmungsgrenze der Auszählungsmethode beträgt und die anfängliche Konzentration von 10^4 je g nicht überschreitet. Abhängig vom untersuchten Lebensmittel wird ein Beimpfungsverfahren verwendet, das praxisrelevante Kontaminationsarten imitiert. Zum Beispiel kann das Inokulum folgendermaßen eingeimpft werden:

- im Inneren (z. B. in gemahlenen Lebensmitteln);
- oder an der Oberfläche (z. B. durch Verteilung mehrerer Beimpfungen auf der Oberfläche oder durch Aufsprühen);

— oder durch großvolumige Beimpfung (z. B. flüssige oder halbflüssige Lebensmittel).

Das Lebensmittel kann direkt durch die Injektion des Inokulums durch adhäsive Wände kontaminiert werden, um die Gasatmosphäre in der Verpackung nicht zu verändern. In diesem Fall muss das Laboratorium sicherstellen, dass die Verpackung während der gesamten Dauer des Tests hermetisch abgedichtet bleibt.

Wenn es das Ziel ist, das bakterielle Verhalten im gesamten Lebensmittel zu untersuchen, sollte das Inokulum homogen in den Prüfeinheiten verteilt werden.

Wenn es das Ziel ist, das bakterielle Verhalten in einem bestimmten Teil (z. B. Inneres oder Oberfläche) zu charakterisieren, sollte die Beimpfung an diesem bestimmten Teil erfolgen.

Wenn mit einem besonders heterogenen Lebensmittel gearbeitet wird, zum Beispiel zusammengesetzte Lebensmittel, muss (müssen) die spezifische(n) Komponente(n) des Lebensmittels und das Beimpfungsverfahren beschrieben und begründet werden. Das Beimpfungsverfahren darf das Verhältnis und die Struktur von mehrphasigen und zusammengesetzten Lebensmitteln nicht verändern.

10 Kontrollprüfungen

Die Ziele der Kontrollprüfungen sind:

- die Repräsentativität der Prüfeinheiten im Vergleich zu dem untersuchten Lebensmittel zu überprüfen (siehe Unterabschnitt 10.1);
- sicherzustellen, dass die Herstellung der Prüfeinheiten keinen Einfluss auf das untersuchte Lebensmittel hat (siehe Unterabschnitt 10.2);
- zusätzliche Informationen zu liefern, die für die Interpretation der Ergebnisse (siehe Abschnitt 13) und den Prüfbericht (siehe Abschnitt 14) verwendet werden.

10.1 Kontrollen der zu untersuchenden Lebensmittel

Das Lebensmittel muss bezüglich relevanter physikalisch-chemischer Eigenschaften (z. B. pH-Wert, a_w , Konzentrationen von Konservierungsmitteln oder Gasatmosphäre) und auf die relevante natürliche Mikroflora (z. B. mesophile Mikroorganismen, psychrotrophe Mikroorganismen, Milchsäurebakterien, Hefen und Schimmelpilze usw.) überprüft werden, da diese Parameter für die Interpretation der Daten relevant sein können. Falls relevant, wird der Kontaminationsgrad der untersuchten Bakterien überprüft.

10.2 Vorbereitung der Kontroll-Prüfeinheiten

Dieser Schritt kann gleichzeitig mit der Untersuchung der Kontrollen des zu untersuchenden Lebensmittels durchgeführt werden (siehe 10.1).

Die in Abschnitt 8 beschriebene sterile physiologische Kochsalzlösung (für die seriellen Verdünnungen) wird zu jeder Kontroll-Prüfeinheit hinzugegeben, indem das gleiche Beimpfungsverfahren wie für die Prüfeinheiten verwendet wird (siehe Abschnitt 9).

Anhang B gibt die Mindestzahl der vorzubereitenden Kontroll-Prüfeinheiten an.

In Anhang B4 werden nur "Tag 0" und "Letzter Tag" betrachtet, es wird jedoch dringend empfohlen, Zwischenanalysepunkte hinzuzufügen, um Änderungen der relevanten Parameter (z. B. pH-Wert, Gasatmosphäre, Konzentrationen von Konservierungsmitteln, natürliche Mikroflora) während des Challenge-Tests zu beobachten.

Die gleichen Prüfeinheiten dürfen zur Messung der physikalisch-chemischen Eigenschaften, Gasatmosphäre und Bestimmung der Konzentration der natürlichen Mikroflora verwendet werden.

Es wird empfohlen, zusätzliche Prüfeinheiten vorzubereiten, um Pannen abzudecken.

11 Lagerung der Prüfeinheiten

Es wird empfohlen, eine Temperatur zu wählen, die das Wachstum des getesteten Mikroorganismus ermöglicht und so nah wie möglich an den beabsichtigten Lagerbedingungen liegt.

Wenn der Zweck des Challenge-Tests die Abschätzung des Wachstumspotenzials ist, müssen die während des Challenge-Tests angewandten Lagerungsbedingungen (Kombination von Zeit und Temperatur) den Bedingungen entsprechen, denen das Lebensmittel wahrscheinlich während der normalen Verwendung bis zum endgültigen Verbrauch ausgesetzt ist (angemessene vorhersehbare Bedingungen für die Lagerung der Lebensmittel durch Hersteller, Vertrieb und Konsument, einschließlich falscher Umgang mit Zeit und Temperatur).

Daten zu Lagerungsbedingungen (Zeit und Temperatur) könnten auf Beobachtungen in den Ländern, in denen sich die Lebensmittelversorgungskette und die Konsumenten befinden, basieren. Falls die Lagerungsbedingungen vollständig und adäquat kontrolliert werden, können Challenge-Tests, welche auf die Schätzung des Wachstumspotenzials ausgelegt sind, bei der definierten und kontrollierten oder bei einer vom Hersteller unabhängig definierten Temperatur durchgeführt werden.

ANMERKUNG Die temperaturbezogenen Lagerungsbedingungen können beispielsweise auf dem 75. Perzentil der beobachteten Daten liegen.

Wenn der Zweck des Challenge-Tests die Abschätzung der Wachstumsparameter (Verzögerungszeit und Wachstumsrate) ist, sollten die Prüfeinheiten während des gesamten Prüfzeitraums bei einer konstanten Temperatur gelagert werden. Es wird empfohlen, eine Temperatur zu wählen, die das Wachstum des getesteten Mikroorganismus ermöglicht und so nah wie möglich an den vernünftigerweise vorhersehbaren Lagerbedingungen liegt, um die Wachstumsparameter bei alternativen Temperaturen zu simulieren. Alle Prüfeinheiten müssen bei den ausgewählten Temperaturen mit einer Toleranz von ± 1 °C inkubiert werden. Die Temperatur muss während des Challenge-Tests aufgezeichnet werden.

Für Produkte, die von natürlichen Umweltbedingungen (z. B. relative Luftfeuchte) beeinflusst werden, kann es notwendig sein, eine Klima-Kontrollkammer zu verwenden, die in der Lage ist, die Lagerungsbedingungen zu imitieren. In diesem Fall müssen die relevanten Umweltbedingungen in der Klima-Kontrollkammer während der Dauer des Challenge-Tests aufgezeichnet werden.

Die Unversehrtheit der Verpackung muss während der Dauer des Challenge-Tests erhalten bleiben.

12 Analyse der Prüfeinheiten

Keimzahlbestimmungen und Messungen physikalisch-chemischer Parameter müssen an verschiedenen Probenahmepunkten, entsprechend dem Versuchsaufbau durchgeführt werden. Für alle Arten von Challenge-Tests muss eine erste Analyse an dem Tag durchgeführt werden, an dem das Lebensmittel beimpft wird, sowie an allen folgenden Probenahmepunkten, die für den Typ des durchgeführten Challenge-Tests relevant sind.

Die physikalisch-chemischen und mikrobiologischen Analysen müssen unter Verwendung von international anerkannten und allgemein anerkannten Methoden oder alternativen Verfahren, die nach international anerkannten Verfahrensanweisungen validiert wurden, durchgeführt werden. In den Fällen, in denen eine Beimpfung auf der Oberfläche des Lebensmittels oder auf einem zusammengesetzten oder heterogenen Lebensmittel erfolgt, sollte die Einwaage vorzugsweise die gesamte Prüfeinheit umfassen. Wenn die Einwaage groß ist (z. B. 100 g), können zwei Schritte verwendet werden, um die Verdünnung 1:10 zu erhalten. Zum Beispiel wird eine 1:2-Verdünnung, gefolgt von einer 1:5-Verdünnung, hergestellt.

ANMERKUNG 1 Unter bestimmten Voraussetzungen (z. B. Lebensmittel ohne natürliche Mikroflora), ist es möglich, einen nicht-selektiven Agar zu verwenden, um den Zielmikroorganismus auszuzählen, was die Regenerationsfähigkeit von verletzten Zellen begünstigt.

ANMERKUNG 2 Das mikrobiologische Laboratorium kann die Volumina, die auf die Kulturmedien für die Isolierung aufgebracht wurden, anpassen, um die Bestimmungsgrenze der verwendeten Methode zu senken.

ANMERKUNG 3 Bei der Durchführung von Challenge-Tests muss nicht zwingend ein (vollständiger) Bestätigungstest an typischen Kolonien als Teil des Auszählungsverfahrens durchgeführt werden.

ANMERKUNG 4 Die Quellen der analytischen Unsicherheit sind im Wesentlichen die Probenahme und die Analysemethode. Wenn die Variabilität der Lebensmittelmatrix oder der experimentellen Beimpfung hoch ist, sollte die Anzahl der Prüfeinheiten je Probenahmepunkt entsprechend erhöht werden. Die Anzahl der Analysen je Probenahmepunkt sollte ebenfalls erhöht werden, falls die analytische Unsicherheit reduziert werden soll.

13 Auswertung der Ergebnisse

Die Auszählungsergebnisse der Einwaagen werden in cfu/g und $\log_{10}$ CFU/g ausgedrückt.

13.1 Schätzung des Wachstumspotenzials (δ)

Wenn eine Charge untersucht wurde, wird der Mittelwert der $\log_{10}$ -Zahl für jeden Probenahmepunkt berechnet. Das Wachstumspotential wird nach der Gleichung: $\delta = \log_h - \log_i$ berechnet, wobei $\log_h$ der höchste dieser Mittelwerte nach der Beimpfung und $\log_i$ der anfängliche Mittelwert ist.

ANMERKUNG In vielen Fällen kann der höchste Mittelwert der endgültige Mittelwert sein.

Wenn drei oder mehr Chargen untersucht werden, muss das Wachstumspotential je Charge nach der Gleichung: $\delta = \log_h - \log_i$ berechnet werden, wobei $\log_h$ der höchste dieser Mittelwerte nach der Beimpfung der Charge und $\log_i$ der anfängliche Mittelwert der gleichen Charge ist. Das endgültige Wachstumspotenzial entspricht dem Höchsten dieser Wachstumspotenziale der drei Chargen.

Das Wachstumspotenzial wird am Ende des Challenge-Tests in $\log_{10}$ ausgedrückt. Wenn $\log_i$ der höchste Wert aus allen entnommenen Prüfeinheiten ist, dann ist das Wachstumspotenzial gleich Null.

Der Challenge-Test wird am "Tag 0" abgelehnt, wenn die Standardabweichung (aufgrund von Messungenauigkeiten und Heterogenität der Kontamination) höher ist als der Grenzwert von $0,5 \log_{10}$ cfu/g.

Anhang D gibt Beispiele für mögliche Schätzungen des Wachstumspotenzials.

Anhang E gibt Hinweise zur Feststellung, ob ein Tag-zu-Tag-Anstieg der Bakterienpopulation signifikant ist oder nicht.

13.2 Schätzung der Wachstumsrate ($\mu_{\max}$)

Wenn mehr als eine Lebensmittel-Charge einem Challenge-Test unterzogen wurde, muss die Wachstumsrate für jede Charge geschätzt werden.

Die maximale Wachstumsrate der Bakterien kann durch lineare Regression des vollständigen Satzes der untersuchten Datenpunkte in der exponentiellen Wachstumsphase ermittelt werden.

Die Wachstumsrate kann auch mit Hilfe des vollständigen Satzes der untersuchten Datenpunkte für die Wachstumskinetik der Bakterienpopulation geschätzt werden, indem ein anerkanntes Modell zum Bakterienwachstum verwendet wird. Anhang D enthält ein Beispiel für die maximale Wachstumsrate, die mit Hilfe eines angepassten Modells zum bakteriellen Wachstum geschätzt wurde.