

DIN EN ISO 20976-2



ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2021-11-03

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Anforderungen und Leitfaden zur Durchführung von Challenge-Tests bei
Lebensmitteln und Futtermitteln –
Teil 2: Challenge-Tests zur Untersuchung von Inaktivierungspotenzial und
kinetischer Parameter (ISO/DIS 20976-2:2021);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 20976-2:2021**

Microbiology of the food chain –
Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products –
Part 2: Challenge tests to study inactivation potential and kinetic parameters
(ISO/DIS 20976-2:2021);
German and English version prEN ISO 20976-2:2021

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Exigences et lignes directrices pour la réalisation des tests d'épreuve microbiologique –
Partie 2: Tests d'inactivation pour étudier le potentiel d'inactivation et les paramètres de
kinétique (ISO/DIS 20976-2:2021);
Version allemande et anglaise prEN ISO 20976-2:2021

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-09-03 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 oder Am DIN-Platz, 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 20976-2:2021) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-06 AA „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ 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 Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 6887 (all parts)	siehe	DIN EN ISO 6887 (alle Teile)
ISO 7218	siehe	DIN EN ISO 7218
ISO 11133	siehe	DIN EN ISO 11133
ISO 11139	siehe	DIN EN ISO 11139
ISO/IEC 17025	siehe	DIN EN ISO/IEC 17025
ISO/TS 17728	siehe	DIN CEN ISO/TS 17728

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

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN CEN ISO/TS 17728, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Probenahmetechniken für die mikrobiologische Untersuchung von Lebensmittel- und Futtermittelproben*

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

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

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

DIN EN ISO 11139, *Sterilisation von Produkten für die Gesundheitsfürsorge — Vokabular, das bei der Sterilisation und zugehöriger Ausrüstung sowie in Prozessnormen verwendet wird*

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

— Leerseite —

<i>Titel de:</i>	Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Anforderungen und Leitfaden zur Durchführung von Challenge-Tests bei Lebensmitteln und Futtermitteln — Teil 2: Challenge-Tests zur Untersuchung von Inaktivierungspotenzial und kinetischer Parameter (ISO/DIS 20976-2:2021)
<i>Titel en:</i>	Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 2: Challenge tests to study inactivation potential and kinetic parameters (ISO/DIS 20976-2:2021)
<i>Titel fr:</i>	Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences et lignes directrices pour la réalisation des tests d'épreuve microbiologique — Partie 2: Tests d'inactivation pour étudier le potentiel d'inactivation et les paramètres de cinétique (ISO/DIS 20976-2:2021)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	12
5 Geräte	13
6 Kulturmedien und Reagenzien	13
7 Untersuchungsdesign und Probenahme	14
7.1 Festlegung des angestrebten Reduktionsniveaus für die Inaktivierungsuntersuchung	14
7.2 Anzahl der Partien	14
7.3 Vorbereitung der Prüfeinheiten	15
7.4 Anzahl der Kontrollproben und Prüfeinheiten	15
8 Auswahl von Stämmen	15
9 Herstellung des Inokulums	16
9.1 Herstellung der vegetativen Zellen	16
9.2 Vorbereitung der Sporen	17
10 Beimpfung der Prüfeinheiten	17
11 Kontrollen	18
11.1 Unbeimpfte Kontrollen	18
11.2 Beimpfte Kontrollen	18
12 Behandlung der Prüfeinheiten	19
13 Analyse	19
14 Angabe der Ergebnisse	20
14.1 Inaktivierungspotenzial	20
14.2 Parameter der Inaktivierungskinetik	21
14.2.1 Parameter der primären Inaktivierungskinetik	21
14.2.2 Parameter der sekundären Inaktivierungskinetik	22
14.3 Simulation der Inaktivierung	22
15 Prüfbericht	23
15.1 Ziel der Untersuchung, Art des Challenge-Tests und angestrebtes Reduktionsniveau	23
15.2 Versuchsverfahrensanweisung	23
15.3 Analyse der Proben	24
15.4 Ergebnisse	24
15.5 Schlussfolgerungen	25
15.6 Referenzdokumente	25
Anhang A (informativ) Auswahl der Art und des Ortes der Inaktivierungsuntersuchung	26

Anhang B (normativ) Mindestanzahl von Einheiten, die für die Inaktivierungsuntersuchung hergestellt werden müssen	27
Anhang C (informativ) Beispiele für Beimpfungstechniken	29
C.1 Direkte Beimpfung.....	29
C.2 Punktbeimpfung	29
C.3 Beimpfung durch Eintauchen	29
C.4 Beimpfung durch Beschichten.....	29
C.5 Beimpfung durch Nebel.....	30
C.6 Beimpfung durch Übertragung	30
Literaturhinweise.....	31

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20976-2:2021) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 20976-2:2021 wurde von CEN als prEN ISO 20976-2:2021 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

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

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

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

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

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

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

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 20976 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Einleitung

Unter den allgemeinen Grundsätzen des Codex Alimentarius zur Lebensmittelhygiene obliegt es den Lebensmittelunternehmern (FBO; en: Food Business Operators), mikrobiologische Gefahren in Lebensmitteln zu kontrollieren und mikrobielle Risiken zu steuern. Daher müssen die Lebensmittelunternehmer innerhalb des HACCP-Konzeptes validierte Maßnahmen zur Beherrschung einsetzen und Untersuchungen durchführen, um die Einhaltung der Kriterien für Lebensmittelsicherheit in der gesamten Lebensmittelkette zu prüfen.

Im Rahmen der mikrobiellen Risikobewertung (MRA; en: Microbial Risk Assessment) wurden mehrere komplementäre Ansätze entwickelt, um die Risiken durch pathogene oder Verderb fördernde Mikroorganismen in der Lebensmittelkette abzuschätzen. Die MRA wird von den Aufsichtsbehörden unter der Federführung der internationalen Agentur für die Erstellung von Lebensmittelstandards angenommen. Die Durchführung von Challenge-Tests ist einer der anerkannten Ansätze, die zur Validierung von Maßnahmen zur Beherrschung innerhalb des HACCP-Systems sowie zur Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit und Qualität von Lebensmitteln, von Prozessen der Lebensmittelproduktion, von Bedingungen der Lagerung von Lebensmitteln und von Empfehlungen für die Zubereitung von für Konsumenten bestimmten Lebensmitteln genutzt werden.

Dieses Dokument enthält daher die technischen Regeln, Berechnungen und Herangehensweisen für die Untersuchung der Fähigkeit eines eingepfachten Mikroorganismus, unter verschiedenen angemessen vorhersehbaren Bedingungen für Lebensmittelprozesse, Lagerung und Verbrauch in Ausgangsstoffen, Zwischen- oder Endprodukten zu wachsen, zu überleben oder inaktiviert zu werden. Das Ziel und der Anwendungsbereich der Untersuchung bestehen darin, den Versuchsaufbau und die Auswahl der Untersuchungsbedingungen festzulegen und den Umfang der mikrobiellen Inaktivierung zu bestimmen. Regulierungsbehörden können unterschiedliche Empfehlungen aussprechen, und diese Unterschiede wurden so weit wie möglich berücksichtigt. Es könnte jedoch erforderlich werden, dass spezifische Anforderungen integriert werden müssen, um eine behördliche Anerkennung des Challenge-Tests zu erhalten.

Da sich die Untersuchungen für Wachstum und Inaktivierung deutlich unterscheiden, besteht diese Internationale Norm aus zwei Teilen unter dem allgemeinen Titel Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Anforderungen und Leitfaden zur Durchführung von Challenge-Tests bei Lebensmitteln und Futtermitteln:

- Teil 1: Challenge-Tests zur Untersuchung von Wachstumspotential, Zeit der lag-Phase und maximaler Wachstumsrate;
- Teil 2: Challenge-Tests zur Untersuchung von Inaktivierungspotenzial und kinetischer Parameter.

Die Verwendung der Normenreihe ISO 20976 erfordert Fachwissen in relevanten Bereichen wie Lebensmittelmikrobiologie, Lebensmittelwissenschaften, Lebensmittelverarbeitung und Statistik. Die statistischen Kenntnisse umfassen ein Verständnis der Theorie der Probenahme, des Versuchsaufbaus, der statistischen Analyse mikrobiologischer Daten sowie einen Überblick über wissenschaftlich anerkannte und verfügbare mathematische Konzepte, die in der prädiktiven Modellierung verwendet werden.

Aus praktischen Gründen umfasst der Begriff Lebensmittel auch Futtermittel.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Verfahrensanweisungen für die Durchführung von mikrobiologischen Challenge-Tests für Inaktivierungsuntersuchungen an vegetativen Bakterien und Bakteriensporen in den Ausgangsstoffen und Inhaltsstoffen sowie in Zwischen- oder Endprodukten fest.

Die Verwendung dieses Dokuments kann auf Hefen erweitert werden, die kein Myzel bilden.

2 Normative Verweisungen

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

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

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

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

3.1

Bakterienspore

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

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.1]

3.2

Partie

Gruppe oder Serie bestimmbarer Erzeugnisse, die anhand eines bestimmten Prozesses unter praktisch identischen Bedingungen gewonnen und an einem bestimmten Ort in einem festgelegten Produktionszeitraum hergestellt werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Partie wird durch Parameter bestimmt, die zuvor von der Organisation aufgestellt werden, und kann mit anderen Begriffen bezeichnet werden, wie beispielsweise „Los“.

[QUELLE: VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 [7]]

3.3

lose Produkte

unverpackte Produkte

Produkte, die nicht in einzelne Einheiten geteilt wurden

[QUELLE: ISO/TS 17728:2015, 3.3.1]

3.4

Challenge-Test

Studie über das Wachstum oder die Inaktivierung einer artifiziell in ein Lebensmittel eingebrachten Bakterienpopulation

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.5]

3.5

Kontrollprobe

mit der Prüfeinheit (3.34) übereinstimmende aber nicht künstlich beimpfte (als Blindprobe dienende) Lebensmitteleinheit

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.4 modifiziert - „kontaminierte“ wurde durch „beimpfte“ ersetzt]

3.6

D-Wert

dezimale Reduktionszeit

Zeit oder Dosis, die erforderlich ist, um im Falle einer linearen Log-Inaktivierungskinetik eine Reduktion des getesteten Mikroorganismus um 90 % unter den angegebenen Bedingungen (z. B.: Temperatur, pH-Wert oder chemische Zusammensetzung) zu erreichen

3.7

8-Wert

dezimale Erstreduktionszeit

Zeit oder Dosis, die erforderlich ist, um im Falle einer nicht linearen Log-Inaktivierungskinetik eine Erstreduktion des getesteten Mikroorganismus um 90 % unter den angegebenen Bedingungen (z. B.: Temperatur, pH-Wert oder chemische Zusammensetzung) zu erreichen

3.8

experimenteller Datenpunkt

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

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Auszählungsergebnisse können in $\log_{10}$ oder als wahrscheinlichste Keimzahl (en: Most Probable Number, MPN) ausgedrückt werden.

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.6]

3.9

Keimung

Vorgang, durch den eine Bakterienspore (3.1) ihre Transformation in eine vegetative Zelle (3.31) einleitet

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.9 geändert „beginnt sich in eine vegetative Zelle zu verwandeln“ durch ihre Transformation in eine vegetative Zelle“ ersetzt]

3.10

Inaktivierungskinetik

Veränderung der Konzentration des Zielmikroorganismus, der einem Inaktivierungsprozess unterzogen wird, im Zeitverlauf

3.11

Inaktivierungsparameter

mathematische Schätzungen, die die Resistenz/Empfindlichkeit des Zielorganismus gegenüber der Behandlung beschreiben; diese werden durch Anpassung von Primär- und Sekundärmodellen erhalten

Anmerkung 1 zum Begriff: Beispiele für diese Parameter sind D , δ , p für die Primärmodelle und z für die Sekundärmodelle.

3.12

Inaktivierungspotenzial

Δ -Wert

logarithmische Reduktion

log-Reduktion

Unterschied in der log-Konzentration ($\log_{10}$ cfu/g oder ml oder cm^2) des Zielmikroorganismus zwischen einem früheren und einem späteren Zeitpunkt, ausgedrückt als $\log_{10}$

3.13

Inaktivierungsprozess

Behandlung, die zur Abtötung oder Inaktivierung des Zielmikroorganismus verwendet wird

3.14

Inokulum

Suspension von Mikroorganismen in der gewünschten Konzentration zur Kontaminierung der Prüfeinheiten

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.12]

3.15

k-Wert

Steigung der Inaktivierungskurve

3.16

p-Wert

Parameter, der die Form der Inaktivierungskurve beschreibt

3.17

pH-Wert

Messung der Konzentration der Azidität oder Alkalinität eines Materials in einer wässrigen Lösung

[QUELLE: ISO 5127:2001:2019, 6.2.29]

3.18

Primärmodell

mathematisches Modell zur Beschreibung der Änderung der Gesamtkeimzahl als Funktion der Zeit

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.16]

3.19

organisierendes Laboratorium

für die Durchführung der Challenge-Tests verantwortliches Laboratorium

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.17]

3.20

Pilotanlage

Produktionsstätte, die dazu dient, ein Experiment oder eine Prüfung durchzuführen, bevor eine breitere Einführung erfolgt

3.21

Verarbeitungsanlage

Ort, an dem Produkte in größerem Umfang hergestellt werden

3.22

Probenahme

Auswahl von einer oder mehreren Einheit(en) oder Portionen von Lebensmitteln, die repräsentativ für dieses Lebensmittel sind

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.18]

3.23

Probenahmepunkt(e)

Zeitpunkt(e), zu dem/denen die Prüfeinheiten für Analysen entnommen werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei der Beurteilung der Inaktivierungskinetik werden diese als experimentelle Datenpunkte auf der Inaktivierungsgrafik dargestellt.

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.19]

3.24

Sekundärmodell

mathematisches Modell zur Beschreibung der Auswirkungen von Faktoren des Inaktivierungsprozesses (wie Temperatur, pH-Wert, a_w) auf das Primärmodell (3.18) (z. B.: D, δ)

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.20 modifiziert – „Umweltfaktoren“ wurde ersetzt durch „Faktoren des Inaktivierungsprozesses“]

3.25

Sporenbildung

Mechanismus, bei dem vegetative Zellen Sporen bilden

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.21]

3.26

Surrogat

nichtpathogener Mikroorganismus, der im Vergleich zum betreffenden Pathogen sowohl in der Matrix als auch unter den untersuchten Verarbeitungsbedingungen eine ähnliche oder höhere Überlebensfähigkeit aufweist

3.27

Überleben

Zustand des Weiterlebens oder des Weiterexistierens ohne signifikante Zunahme oder Abnahme der Lebensfähigkeit

3.28

angestrebtes Reduktionsniveau

angestrebtes Inaktivierungsniveau, ausgedrückt in $\log_{10}$

3.29

t_0

Zeitpunkt, an dem die Behandlung beginnt

3.30

t_{end}

Zeitpunkt, an dem die Behandlung endet

3.31

t_{inoc}

Zeitpunkt, an dem der Mikroorganismus in das Lebensmittel eingepflegt wird

3.32

t_{xD}

Behandlungszeit, die für eine x-log-Reduktion des Zielmikroorganismus benötigt wird

3.33

Prüfmenge

aus der Laborprobe (3.34) entnommene, abgemessene (Volumen oder Masse) repräsentative Probe zur Verwendung bei der Analyse

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

3.34

Prüfeinheit

abgemessene (Volumen oder Masse) Menge Lebensmittel, die für die Beimpfung, anschließende Verarbeitung und Analyse verwendet wird

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.24]

3.35

Behandlung

jeder Prozess, jede Rezeptur oder Produkteigenschaft oder eine Kombination davon, der/die dazu vorgesehen ist, den Zielmikroorganismus zu inaktivieren

3.36

vegetative Zelle

Zustand einer mikrobiellen Zelle, bei dem diese in der Lage ist, unter günstigen Umweltbedingungen zu wachsen

[QUELLE: ISO 20976-1:2019, 3.25]

3.37

a_w

Wasseraktivität

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

[QUELLE: ISO 18787:2017]

3.38

z-Wert

Änderung der Behandlung (z. B.: Temperatur, pH-Wert, a_w), die eine 10-fache Änderung des D-Wertes hervorruft

Anmerkung 1 zum Begriff: T, pH, a_w können dem z-Wert als Index hinzugefügt werden, um die zu beurteilende Behandlung zu kennzeichnen.

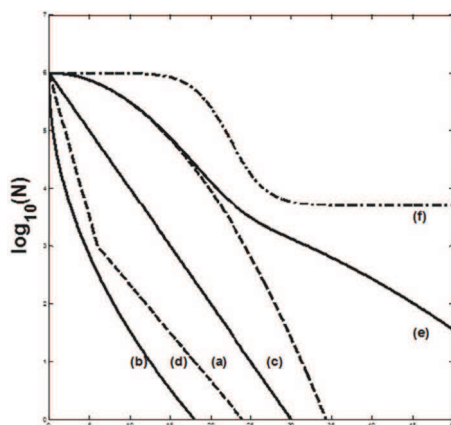
4 Kurzbeschreibung

Inaktivierungsuntersuchungen sind dafür vorgesehen, die Änderungen der Konzentration des Zielmikroorganismus im Verlauf des Challenge-Tests zu bestimmen. Diese Untersuchungen können verwendet werden, um zu beurteilen, ob eine signifikante mikrobielle Inaktivierung in einem Lebensmittel vorliegt, und um die Abnahme des Zielmikroorganismus unter gegebenen Verarbeitungsbedingungen und/oder einer bestimmten Rezeptur des Lebensmittelerzeugnisses zu quantifizieren. Der Anwendungsbereich und das Ziel der Untersuchung müssen klar festgelegt sein (z. B. Beurteilung/Validierung der Wirksamkeit des Lebensmittelprozesses als Maßnahmen zur Beherrschung, Bewertung der mikrobiellen Stabilität und des Überlebens), einschließlich des angestrebten Reduktionsniveaus und der Entscheidungskriterien. Der Versuchsaufbau muss in Übereinstimmung mit diesem Ziel erfolgen und muss die Prozessschritte und die Lebensmittelkette, für die die mikrobielle Inaktivierung beurteilt wird, berücksichtigen. Daten der Lebensmittelunternehmer (z. B. zu den Eigenschaften ihrer Produkte und Herstellungsverfahren) müssen mit den Kenntnissen über Lebensmittelmikrobiologie und Analytik kombiniert werden, um die Aussagekraft der Untersuchung sicherzustellen (siehe 14.2.1). Im Idealfall wird bei Inaktivierungsuntersuchungen der Zielmikroorganismus verwendet. Bei Challenge-Test-Untersuchungen, die innerhalb von Lebensmittelproduktionsanlagen durchgeführt werden, ist anstelle des Zielpathogens ein validiertes Surrogat zu verwenden [32].

Das organisierende Laboratorium (siehe 3.19) muss für die Entwicklung und Durchführung der Untersuchungen, die Interpretation der Ergebnisse und das Ziehen von Schlussfolgerungen über Kenntnisse und Fähigkeiten in Lebensmittelmikrobiologie, Lebensmittelwissenschaften und -technologie sowie in Statistik verfügen. Die Untersuchungen müssen im Rahmen eines Qualitätssicherungssystems durchgeführt werden (z. B. ISO/IEC 17025 [2]).

Um einen Inaktivierungs-Challenge-Test durchzuführen, sollte das Inokulum so vorbereitet werden, dass die mikrobiellen Zellen oder Sporen an die Umgebungsbedingungen angepasst sind, die die Lebensmittelverarbeitungsumgebung imitieren; dadurch wird eine natürliche mikrobielle Reaktion gefördert, sobald das Lebensmittel mit ihnen beimpft wird.

Der gleiche Mikrobenstamm könnte in Abhängigkeit von der Behandlung unterschiedliche Formen aufweisen (siehe Bild 1) [14]. Die heterogenen Formen der mikrobiellen Inaktivierungskurven sind das Ergebnis der mikrobiellen Resistenz oder einer adaptiven Reaktion bzw. der Zellheterogenität [13].



Inaktivierungsbehandlung (Zeit oder Dosis)

Bild 1 — Beispiele für Typen mikrobieller Inaktivierungskurven: log-linear (a), konkav (b), konvex oder mit einem Wendepunkt (c), mit einem Knick oder biphasisch (d, e) und sigmoidal (f)

Es gibt zwei Arten von Inaktivierungsuntersuchungen: Untersuchungen zum Inaktivierungspotenzial und zur Inaktivierungskinetik eines Zielmikroorganismus.

Die Untersuchungen zum Inaktivierungspotenzial sind am besten für die Prozessvalidierung und/oder Produktrezeptur geeignet. Die Ergebnisse des Inaktivierungspotenzials sind spezifisch für die untersuchten Bedingungen und die untersuchte Matrix. Um auf andere Bedingungen zu extrapolieren, müssen inaktivierungskinetische Parameter verwendet oder eine neue Untersuchung zum Inaktivierungspotenzial durchgeführt werden.

Die Untersuchungen zur Inaktivierungskinetik dienen der Charakterisierung der Inaktivierung des Mikroorganismus durch die Bestimmung von Inaktivierungsparametern wie D-, δ - und z-Werten. Diese Untersuchungen sind komplexer im Hinblick auf das Untersuchungsdesign, die Ausführung sowie die Ergebnisinterpretation und -auswertung, insbesondere im Falle von Nichtlinearität (siehe Bild 1), ermöglichen aber die Extrapolation der Ergebnisse auf nicht untersuchte Bedingungen innerhalb des Untersuchungsbereichs.

5 Geräte

Es ist Standard-Laborausrüstung nach den Angaben in ISO 7218 erforderlich. Für die Vorbereitung der Prüfmengen, deren angemessene Lagerung oder zur Überwachung der Änderungen ihrer Eigenschaften während des Challenge-Tests kann auch spezielle Laborausrüstung nötig sein. Diese umfasst:

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

5.2 Klimakammer, geeignet, um Solltemperaturen auf ± 1 °C zu erreichen und zu halten und die relative Luftfeuchte auf ± 10 % einstellen zu können.

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

5.4 a_w -Messgerät, das die Anforderungen nach ISO 18787 erfüllt.

5.5 Headspace-Gasanalysegerät zur Messung der Gaszusammensetzung (z. B. O₂, CO₂).

5.6 Logger zur Messung der Temperatur der Prüfeinheit.

5.7 Logger zur Messung der relativen Luftfeuchte der Prüfeinheit.

5.8 Gerät zur Messung der Inaktivierungsbehandlung (z. B. Dosimeter für Bestrahlungsbehandlung, Sonde für Wärmebehandlung) **der Prüfeinheit.**

5.9 Gerät (Pilotanlage oder Ausrüstung in einem Labor) zur Durchführung der Inaktivierungsbehandlung, das vorhersehbare Produktionsbedingungen imitiert, die zur mikrobiellen Inaktivierung führen.

5.10 Industrielles Ausrüstungsteil zur Durchführung der Inaktivierungsuntersuchung auf Werksebene.

6 Kulturmedien und Reagenzien

Die aktuellen Laborpraktiken nach ISO 7218 sind zu beachten.

Zur Vorbereitung und Durchführung der Tests an Kulturmedien und Reagenzien sind die Verfahren nach ISO 11133 sowie nach den Angaben in der jeweiligen Internationalen Norm zu beachten, die sich mit dem Zielmikroorganismus befasst. Es sind relevante international anerkannte und gemeinhin akzeptierte Verfahren für den Nachweis oder die Auszählung von geschädigten Zielmikroorganismen zu verwenden (z. B.: Verwendung eines selektiven Agars und eines nicht selektiven Agars mit einem Zweischichtverfahren).

7 Untersuchungsdesign und Probenahme

Das Untersuchungsdesign und die Probenahme sind abhängig vom angestrebten Reduktionsniveau, dem Prozess, der Rezeptur und den Produkteigenschaften. Die Faktoren, die sich auf die Inaktivierung auswirken, sind eindeutig zu identifizieren und ihr Wertebereich ist zu definieren.

Es gibt zwei Arten von Challenge-Tests für Inaktivierungsuntersuchungen: Tests zum Inaktivierungspotenzial und zur Inaktivierungskinetik. Das Ziel der Untersuchung und die verwendeten Technologien bestimmen die Art (siehe Anhang A).

Für das Inaktivierungspotenzial sind Prüfeinheiten mindestens zu Beginn und am Ende der Behandlung zu entnehmen.

Für die Inaktivierungskinetik sind Prüfeinheiten an jedem Probenahmepunkt während der gesamten Behandlungsdauer zu entnehmen. Wenn der Zugang zur Probenahme während der Verarbeitung aufgrund der bewerteten Ausrüstung und/oder Technologie nicht möglich ist, können unabhängige Behandlungen unterschiedlicher Länge erforderlich sein.

Die damit verbundene erwartete Variabilität bestimmt die Anzahl der zu berücksichtigenden Partien und Prüfeinheiten (siehe Anhang B).

Das Untersuchungsdesign muss verschiedene Quellen der Variabilität berücksichtigen, die mit Folgendem zusammenhängen:

- Prozesscharakteristika (z. B. Durchflussrate, Verweilzeit, Temperatur, Feuchte, Ausrüstungsdesign);
- Rezeptur- und Produkteigenschaften (z. B. Fett, Zucker, Salz, a_w , Protein, Säure, pH-Wert, Partikelgröße, chemische Zusammensetzung, natürliche Mikroflora, Konzentration von Konservierungsmitteln, Gasatmosphäre);

und, sofern zutreffend (z. B. Untersuchungen zu Konservierungsstoffen), Transport- und Lagerbedingungen (z. B.: Feuchte, Verpackung) während der Haltbarkeitsdauer.

Das Untersuchungsdesign muss auch das angestrebte Reduktionsniveau berücksichtigen.

7.1 Festlegung des angestrebten Reduktionsniveaus für die Inaktivierungsuntersuchung

Je nach Ziel des Challenge-Tests muss das angestrebte Reduktionsniveau bei Beginn der Untersuchung festgelegt werden. Es kann sich auf behördliche Anforderungen oder auf interne Anforderungen beziehen. Laboratorien, die Inaktivierungsuntersuchungen an Produkten durchführen, die Vorschriften unterliegen, sollten die aktuellen Anforderungen kennen. Das angestrebte Reduktionsniveau beeinflusst die Konzentration des zu verwendenden Inokulums. Es kann je nach Lebensmitteltyp variieren (z. B. wurde für die *Salmonellen*-Inaktivierung eine 4 log₁₀-Reduktion für die Behandlung von Mandeln [11] und eine 7 log₁₀-Reduktion für Geflügelprodukte [12] gefordert). Um das angestrebte Reduktionsniveau analysieren zu können, müssen die Bestimmungsgrenze des verwendeten Analyseverfahrens und die Inokulumkonzentration geeignet sein.

7.2 Anzahl der Partien

Die Anzahl der in die Untersuchung einzubeziehenden Partien hängt von der Variabilität des Lebensmittel-Herstellungsprozesses und den Lebensmittelcharakteristika ab (siehe Anhang B). Die Merkmale der untersuchten Partien müssen für die Variabilität des Herstellungsprozesses auf der Grundlage historischer Daten repräsentativ sein.

Es sollten mindestens drei Partien für die Untersuchung sowohl des Inaktivierungspotenzials als auch der Inaktivierungskinetik verwendet werden. Im Allgemeinen sollte die Anzahl der Partien in Situationen mit höherer Variabilität oder Unsicherheit erhöht werden.

Die Verwendung nur einer Partie muss klar begründet werden, zum Beispiel:

- i) zur Bewertung der Auswirkungen einer neuen Rezeptur des Lebensmittels;
- ii) zur Verwendung einer Partie, welche die ungünstigsten Inaktivierungsbedingungen bietet (also den ungünstigsten Fall darstellt);
- iii) wenn mehrere Stufen der Behandlung in Untersuchungen zur Inaktivierungskinetik bewertet werden.

7.3 Vorbereitung der Prüfeinheiten

Für die Matrix (Ausgangs- und Inhaltsstoffe, Zwischen- oder Endprodukte) repräsentative Prüfeinheiten vor der Inaktivierungsbehandlung können sein:

- aseptisch beprobte Mengen des losen Produkts aus der Produktionslinie;
- aseptisch beprobte Mengen oder der gesamte Inhalt der Verpackungseinheit(en).

Die Prüfeinheiten müssen vor der Beimpfung unter geeigneten Bedingungen gehalten werden und vorzugsweise so bald wie möglich nach der Herstellung beimpft werden, sofern das Ziel der Untersuchung nichts anderes festlegt. Nach der Beimpfung sind alle Prüfeinheiten, einschließlich „t₀“ (siehe Bild 2), unter den gleichen geeigneten Bedingungen zu halten, sofern erforderlich einschließlich Transport und Lagerung.

7.4 Anzahl der Kontrollproben und Prüfeinheiten

Die Mindestanzahl der zu analysierenden Einheiten hängt von der Art der Inaktivierungsuntersuchung, der Art des Lebensmittels und den Verarbeitungsbedingungen ab (siehe Anhang B).

Bei Untersuchungen zum Inaktivierungspotenzial ist die Anzahl der Probenahmepunkte von der Zugänglichkeit der Proben abhängig. In einigen Fällen kann es nur möglich sein, Proben am Anfang und am Ende des Prozesses zu erhalten. In anderen Fällen kann es möglich sein, Zwischenproben zu erhalten.

Für Untersuchungen zur Inaktivierungskinetik ist es wichtig, genügend experimentelle Datenpunkte zur Verfügung zu haben, um eine genaue Schätzung des Kurventyps zu erhalten (siehe Bild 1). Für lineare Kurventypen sind mindestens sechs Probenahmepunkte erforderlich. Für nicht lineare Kurventypen sind in der Regel mehr Probenahmepunkte erforderlich.

Die Anzahl der Einheiten sollte in Situationen mit hoher Variabilität oder Unsicherheit in Bezug auf Lebensmittel- und Prozesseigenschaften erhöht werden. Es wird empfohlen, dass zusätzliche Kontrollen vorbereitet werden, um unvorhergesehene Zwischenfälle zu berücksichtigen.

8 Auswahl von Stämmen

Jeder verwendete Stamm muss biochemisch und/oder serologisch und/oder genetisch ausreichend detailliert charakterisiert werden, um seine Identität zu ermitteln. Stämme, die zuvor aus der Lebensmittelmatrix (Ausgangsstoffe, Inhaltsstoffe, Endprodukte) oder aus der Herstellungsumgebung oder aus klinischen/Lebensmittel-/Umweltproben nach Ausbrüchen unter Bezug auf Lebensmittel isoliert wurden, werden bevorzugt.

Die ursprüngliche Quelle aller Isolate sollte bekannt sein und die Isolate 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. Es werden Stämme verwendet, für die der/die Inaktivierungsparameter (z. B. D-, k- oder δ -Werte) zuvor in einer ähnlichen Matrix (z. B. Hitze-, Druck-, Säurebeständigkeit) bestimmt wurden, um sicherzustellen, dass der ausgewählte Stamm/die ausgewählten Stämme für den Zweck geeignet ist/sind. Wenn die Matrix nicht ähnlich ist, muss eine Voruntersuchung zur Messung der Resistenz durchgeführt werden [32].

Cocktails aus drei bis fünf für den Zweck geeigneten Stämmen sind für Untersuchungen des Inaktivierungspotenzials geeignet. Für die Inaktivierungskinetik dürfen die Stämme nur einzeln untersucht werden.

Im Idealfall wird bei Inaktivierungsuntersuchungen der Zielmikroorganismus verwendet. Bei Pathogenen ist dies möglich, wenn die Untersuchung in einem Labor oder einer Pilotanlage durchgeführt wird. In Fabriken oder Lebensmittelverarbeitungsbetrieben ist dies jedoch nicht möglich (siehe Anhang A). In solchen Fällen ist ein Surrogat zu verwenden. Die Eignung des ausgewählten Surrogats ist in Bezug auf den zu bewertenden Pathogen, die Lebensmittelmatrix und die Behandlung zu begründen und zu dokumentieren. Andernfalls ist eine spezifische Surrogatvalidierungsuntersuchung durchzuführen und zu dokumentieren [32].

9 Herstellung des Inokulums

Um den Verdünnungseffekt beim Beimpfen der Prüfeinheiten zu berücksichtigen, muss die Inokulumkonzentration größer sein als die angestrebte log-Reduktion. In einigen Fällen müssen Voruntersuchungen durchgeführt werden, um die angestrebte Inokulumkonzentration zu erreichen, z. B. durch Zentrifugation oder durch Anzucht auf festem Medium, um das Volumen zu minimieren.

9.1 Herstellung der vegetativen Zellen

Die Stämme werden so vorbereitet, dass ein standardisiertes Inokulum mit physiologischen Bedingungen und Konzentrationen entsteht, die für den Zweck geeignet sind.

Die Kultur sollte zunächst in nichtselektiven Medien und unter für ein optimales Wachstum geeigneten Bedingungen gezüchtet werden. Diese Kultur kann unter optimalen Bedingungen verwendet oder so angepasst werden, dass die Bedingungen einer möglichen Kontamination imitiert werden. Beispiele für Anpassungen können pH-Wert, Säureart, Temperatur, a_w , Salzgehalt, Zuckergehalt, flüssige oder feste Medien und Atmosphäre sein.

Die mikrobielle Konzentration des Inokulums muss unter Verwendung von international anerkannten und gemeinhin akzeptierten Verfahren oder von Alternativverfahren, die nach international anerkannten Verfahrensanweisungen validiert wurden, geschätzt werden. Dieses Inokulum kann durch Zentrifugation so konzentriert werden, dass es der Zielkonzentration entspricht. Wenn ein Cocktail verwendet wird, sollten die Stämme einzeln vorbereitet und in äquivalenten Konzentrationen gemischt werden.

Zusätzlich muss die Keimzahl des vorbereiteten Inokulums durch Auszählung auf dem gleichen Medium, das auch für den Challenge-Test verwendet wird, zum Zeitpunkt t_{inoc} (siehe Bild 2) bestätigt werden.

Vegetative Zellen werden zur direkten Beimpfung (Nassinokulum) oder zur Aufbereitung für die weitere Verwendung in Trockenanwendungen verwendet.

Für Untersuchungen an Lebensmitteln mit geringem Feuchtegehalt können Techniken zur Herstellung von Trockeninokulum erforderlich sein. Das Inokulum kann ohne Trägermaterial hergestellt (z. B. Gefrier-trocknung, Vakuum) oder auf einem Trägermaterial (z. B. Perlen, Sand, Kreide, Talkum, Mehl, pulverisierte Form des Produkts oder ein dem Prüflebensmittel ähnliches Produkt) getrocknet werden. Bei der Herstellung von getrocknetem Inokulum kann es mehrere Tage dauern, bis sich der Mikroorganismus bei einer bestimmten Konzentration stabilisiert hat. Die Anzahl der lebensfähigen Keime des stabilisierten getrockneten Inokulums muss vor der Verwendung ermittelt werden.