

## **Leitfaden der ALTS - Arbeitsgruppe „Hygiene und Mikrobiologie“ zur Verifizierung von Referenz- und validierten alternativen Verfahren nach DIN EN ISO 16140 Teil 3 in amtlichen Untersuchungseinrichtungen**

### **Inhalt**

Vorwort.....	2
Einleitung.....	2
Durchführung der Verifizierung von mikrobiologischen Methoden in einem akkreditierten Labor.....	3
1 Zweck.....	3
2 Anwendungsbereich der Norm.....	3
2.1 Allgemeine Prinzipien für die Verifizierung von Prüfmethoden.....	3
2.2 Anwendung der Norm während der Übergangsfrist bis zum 01.01.2028.....	5
3 Auffassung der ALTS- Sachverständigen zur Mitberücksichtigung der Kompetenz akkreditierter Anwenderlabors.....	6
3.1 Voraussetzungen für eine Reduzierung.....	7
3.2 Möglichkeiten für eine Reduzierung bzw. Vereinfachung.....	7
3.2.1 Allgemeine Reduzierungsmöglichkeiten.....	7
3.2.2 Reduzierungs-/Vereinfachungsmöglichkeiten für qualitative Prüfverfahren.....	7
3.2.3 Reduzierungsmöglichkeiten für quantitative Prüfverfahren.....	8
4 Begriffsbestimmungen.....	8
5 Durchführung der Verifizierung qualitativer und quantitativer Verfahren.....	9
5.1 Durchführung für qualitative Verfahren.....	9
5.1.1 Analyse der Validierungsdaten.....	9
5.1.2 Erstellung eines Verifizierungsplans.....	9
5.1.3 technische Durchführung nach Arbeitsvorschrift 1.....	10
5.1.4 Auswertung und Dokumentation mittels Verifizierungsbericht.....	12
5.2 Durchführung für quantitative Verfahren.....	13
5.2.1 Verifizierung der Implementierung - $S_{IR}$ .....	13
<b>5.2.1.1 Analyse der Validierungsdaten.....</b>	<b>13</b>
<b>5.2.1.2 Erstellung eines Verifizierungsplans.....</b>	<b>13</b>
<b>5.2.1.3 Erstellung eines Verifizierungsberichts.....</b>	<b>13</b>
5.2.2 Verifizierung der Lebensmitteleinheit - geschätzte systematische Abweichung (eBias) 13	
<b>5.2.2.1 Analyse der Validierungsdaten.....</b>	<b>14</b>
<b>5.2.2.2 Erstellung eines Verifizierungsplans.....</b>	<b>14</b>
<b>5.2.2.3 Durchführung.....</b>	<b>15</b>
<b>5.2.2.4 Dokumentation mittels Verifizierungsbericht.....</b>	<b>15</b>
5.3 Durchführung für alternative Bestätigungs- und Typisierungsverfahren.....	16
6 Literatur.....	16

Hilfsmaterialien der ISO.....	16
Anhänge .....	17

## **Vorwort**

Im Juni 2021 wurde die DIN EN ISO 16140 Teil 3 Verfahrensvalidierung - Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz- und validierten alternativen Verfahren in einem Einzel-Labor (ISO 16140-3:2021); Deutsche Fassung EN ISO 16140-3:2021 veröffentlicht.

Im Teil 3 der Norm wird die Verifizierung von mikrobiologischen Prüfverfahren behandelt, welche die Voraussetzung für den QM-gerechten Einsatz validierter Normen in jedem Anwenderlabor darstellt. Aufgrund seiner detailreichen Anforderungen stellt dieser Normenteil eine übermäßige zusätzliche Belastung in Arbeitskapazität und Material für die Labore dar.

Als internationale Norm zielt die ISO 16140-3 nicht auf die alleinige Verwendung in akkreditierten Labors und beinhaltet folglich sehr umfassende Regelungen und Qualitätssicherungselemente zur Sicherstellung einer ausreichenden Leistungsfähigkeit des Labors. Im akkreditierten Labor sind viele dieser Maßnahmen bereits durch langerprobte Verfahren – wie z. B. die Bestimmung der Messunsicherheit, die Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen oder die Medientestung nach DIN EN ISO 11133 (ISO 11133) – gewährleistet, was von der Norm aber nicht aufwandsminimierend berücksichtigt wird.

Da es sich zudem um die Verifizierung validierter Normverfahren handelt, welche im Rahmen ihrer Validierung bereits umfangreiche Studien anhand unterschiedlicher Matrizes, Keimarten und Kontaminationsniveaus durchlaufen haben, sollte der Prüfaufwand bei deren Verifizierung im Anwenderlabor zumindest dann reduziert werden können, wenn die Einführung in einem akkreditierten Labor mit regelmäßig zertifiziertem QM-System vorgesehen ist.

Diese Überlegungen waren der Anlass für die Ländersachverständigen der ALTS-Arbeitsgruppe „Hygiene und Mikrobiologie“, sich mit dem Thema der Verifizierung validierter Normen im Anwenderlabor zu befassen und für die amtlichen Labore eine Empfehlung zu erarbeiten, welche die Mindestanforderungen für akkreditierte Laboratorien darstellt und Hilfestellungen für die Durchführung der Verifizierung von Prüfverfahren gibt. Der vorliegende Leitfaden bezieht sich dabei nur auf mikrobielle (Bakterien und Pilze) Nachweis- und Zählverfahren im Untersuchungsspektrum der Labore.

## **Einleitung**

Voraussetzung für belastbare mikrobiologische Untersuchungsergebnisse sind neben der Verwendung geeigneter validierter, regelmäßig kontrollierter Prüfverfahren, die Eignung und der ordnungsgemäße Zustand der Ausstattung, die Eignung und Erfahrung des Laborpersonals sowie die Zuverlässigkeit und Leistungsfähigkeit der verwendeten Nährmedien. Mittels eines geeigneten Verifizierungsverfahrens muss im Anwenderlabor geprüft werden, ob das Wechselspiel der o. g. Einflussfaktoren eine ausreichende Ergebnissicherheit gewährleistet.

In Laboratorien, die validierte oder normierte qualitative und quantitative Verfahren zum Nachweis von Keimen in verschiedenen Matrizes (incl. Differenzierung und Identifizierung) verwenden, soll gem. ISO 16140-3 eine Verifizierung der Prüfmethode durchgeführt werden. Hierbei fehlt nach Auffassung der ALTS-Sachverständigen bei der Festlegung des Verifizierungsumfangs die

Berücksichtigung des **QM-Status** des Labors sowie von bereits vorliegenden und dokumentierten **Erfahrungen** mit der Durchführung mikrobiologischer Untersuchungen.

Der vorliegende Leitfaden gibt Empfehlungen zu Häufigkeit und Umfang von Verifizierungsmaßnahmen, die nach Auffassung der ALTS-Sachverständigen zur Sicherung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse von Prüfverfahren erforderlich sind.

Die Umsetzung und Anpassung an die Erfordernisse des jeweiligen Labors muss durch den Laborverantwortlichen erfolgen.

## **Durchführung der Verifizierung von mikrobiologischen Methoden in einem akkreditierten Labor**

### **1 Zweck**

Nach Pkt. 7.2.1.5 der DIN EN ISO/IEC 17025:2018-03 (ISO/IEC 17025) muss das Labor vor der Einführung eines genormten Prüfverfahrens belegen, dass es dieses Verfahren ordnungsgemäß durchführen kann. Dazu muss es darlegen, dass es die im Validierungsverfahren der Norm festgelegte Leistungsfähigkeit erreicht (= Verifizierung). Bei jeder Änderung/Überarbeitung des Prüfverfahrens muss die Notwendigkeit einer Wiederholung der Verifizierung (z. B. bei Änderungen erheblicher Art („major technical changes“)) und der erforderliche Umfang (z. B. komplett bei Änderung des Nährmediums oder nur einzelne Abschnitte wie die Bestätigungsreaktionen) vom Labor geprüft werden.

### **2 Anwendungsbereich der Norm**

Die „Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz- und validierten alternativen Verfahren in einem Einzel-Labor“ ISO 16140-3 richtet sich an alle Laboratorien, die normative Dokumente in ihrem Labor für die dort durchzuführenden Untersuchungen anwenden.

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

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

Zu den normativen Dokumenten gehören z. B. validierte bzw. derzeit noch unvalidierte oder nicht vollständig validierte ISO-Verfahren oder Verfahren nach § 64 LFGB.

Für akkreditierte Laboratorien, wie die amtlichen Untersuchungseinrichtungen, wird die Durchführung von Verifizierungsmaßnahmen in Anlehnung an ISO 16140-3 verbindlich gefordert (vergl. ISO/IEC 17025 Zif. 7.2.1.5).

#### **2.1 Allgemeine Prinzipien für die Verifizierung von Prüfmethoden**

Bevor ein Referenzverfahren veröffentlicht und im Anwenderlabor verwendet wird, wird im Allgemeinen ein zweistufiger Prozess durchlaufen:

Vor der Freigabe als Referenzverfahren erfolgt in der Regel als erste Stufe eine **Validierung**, bei der die Leistungsmerkmale des Referenzverfahrens ermittelt werden und der objektive Nachweis erbracht wird, dass die Leistungsanforderungen für eine festgelegte und dafür vorgesehene Anwendung erfüllt sind.

Im Anwenderlabor muss dann in einer zweiten Stufe - der **Verifizierung** - nachgewiesen werden, dass der Anwender das validierte Verfahren zufriedenstellend durchführen kann.

Sofern es sich nicht um ein bereits validiertes Referenzverfahren handelt, muss der Anwender das Verfahren vor dessen Implementierung in seinem Labor zunächst validieren.

Der **Anwendungsbereich** des Referenzverfahrens legt fest, für welche Matrizes das Prüfverfahren (des Anwenderlabors) angewendet werden kann.

In einer Validierungsuntersuchung ist es nicht möglich, alle vorhandenen Lebensmittel zu prüfen. Wenn mindestens fünf verschiedene Lebensmittelkategorien validiert sind, gilt das Verfahren als validiert für ein „**Breites Spektrum von Lebensmitteln**“, das den 15 Lebensmittelkategorien in ISO 16140-3, Anhang A entspricht.

Für den Anwendungsbereich „**Eingeschränktes Spektrum von Lebensmitteln**“ wird bei der Validierung eine begrenzte (< 5) Anzahl von Lebensmittelkategorien geprüft. Das bedeutet, dass der Anwendungsbereich der Validierung auf die geprüften Kategorien beschränkt ist. Folglich darf das Anwenderlabor Verfahren mit eingeschränktem Spektrum nicht mit Kategorien außerhalb des begrenzten Anwendungsbereichs verifizieren.

Bei der **Verifizierung** liegt der Schwerpunkt auf Lebensmitteln (im Folgenden „Matrizes“), die bei der Validierung verwendet wurden und die im Anwendungsbereich des jeweiligen Labors liegen.

Für die Verifizierung müssen zwei Nachweise geführt werden:

- Die **Verifizierung der Implementierung** dient dazu, die Kompetenz des Anwenderlabors zur Durchführung des validierten Verfahrens darzustellen.
- Die **Verifizierung der (Lebensmittel-)Einheit** ist der Nachweis, dass das Anwenderlabor für die Durchführung des validierten Verfahrens mit im Anwenderlabor geprüften Matrizes kompetent ist.

Der **Verifizierungsablauf** umfasst dabei folgende Verfahrensschritte:

**Analyse der Validierungsdaten** aus der umzusetzenden Referenzmethode bezüglich validierter Matrizes und Leistungsmerkmale.

Erstellung eines **Verifizierungsplanes**

- Auswahl der zu verifizierenden Matrizes und Zielkeime
- Festlegung der Probenumfänge und Leistungsmerkmale
- Beschreibung der Methodik für die Untersuchung

Erstellung eines **Verifizierungsberichtes**

- Darstellung der erzielten Untersuchungsergebnisse und Leistungsmerkmale
- Bewertung, ob die erforderlichen Leistungsmerkmale erfüllt und die Anwenderkompetenz vorhanden ist

Von entscheidender Relevanz für die Verifizierung sind somit die Validierungsdaten der zu etablierenden Referenzmethoden – insbesondere der Anwendungsbereich, die verwendeten Matrizes und die ermittelten Leistungsmerkmale.

Diese Angaben sowie der geplante Anwendungsbereich im Labor bestimmen Art und Anzahl der zu verifizierenden Matrizes und einzuhaltende Leistungsgrenzen. Die Angaben lagen allerdings bei Erscheinen der Norm noch nicht für alle Referenzmethoden vor (vergl. Kap. 2.2, Übergangsfrist).

Andere qualitätssichernde Maßnahmen und nachgewiesene Kompetenzen des Anwenderlabors werden in ISO 16140-3 nicht angesprochen und bleiben bei der Verifizierung unberücksichtigt. Nach Auffassung der ALTS-Sachverständigen sollten diese Kriterien bei der Festlegung des Prüfungsumfangs aber Berücksichtigung finden. Hierauf wird in Kapitel 2.3 eingegangen.

## **2.2 Anwendung der Norm während der Übergangsfrist bis zum 01.01.2028**

Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der ISO 16140-3 sind einige Referenzverfahren noch nicht (vollständig) validiert und würden daher nicht in den Anwendungsbereich dieser Norm fallen.

Da die Normungsinstitute (einschließlich der ISO- und CEN-Komitees) Zeit brauchen werden, um ihre Referenzverfahren zu validieren und danach neu zu veröffentlichen, erarbeiteten die ISO- und CEN-Komitees eine Regelung für diese Übergangszeit der Einführung der ISO 16140-3 (*Übergangszeit für die Umsetzung von ISO 16140-3*, Version vom 19.01.2021).

Für die Verifizierung im Anwenderlabor hat ISO hierzu folgende Regelungen getroffen:

	<b>Validierte Referenzmethoden</b>	<b>Nicht validierte Referenzmethoden</b>
Bereits vor Inkrafttreten der ISO 16140-3 im Anwenderlabor akkreditiert  <b>(vor Juni 2021)</b>	Keine Re-Verifizierung erforderlich solange keine Änderungen erheblicher Art („ <i>major technical changes</i> “) der Norm erfolgen	Keine Re-Verifizierung erforderlich
Im Übergangszeitraum neu ins Laborspektrum aufgenommen  <b>(Juni 2021 bis 31.12.2027)</b>	<u>Änderungen</u> bei Techniken/Agentien <u>in der Norm</u> müssen <b>gemäß ISO 16140-3 revalidiert</b> werden, falls es sich um Änderungen erheblicher Art „ <i>major technical changes</i> “ handelt;	<u>Änderungen</u> bei Techniken/Agentien <u>in der Norm</u> müssen <b>gemäß Anhang F der ISO 16140-3 revalidiert</b> werden, falls es sich um Änderungen erheblicher Art „ <i>major technical changes</i> “ handelt
	Bei <u>Änderung</u> der Matrizes/Techniken* <u>im Anwenderlabor</u> müssen diese im Spektrum der Norm vorhanden sein und im Anwenderlabor <b>gemäß ISO 16140-3 validiert</b> werden	Bei <u>Änderung</u> der Matrizes/Techniken* <u>im Anwenderlabor</u> müssen diese im Anwenderlabor <b>gemäß Anhang F der ISO 16140-3 validiert</b> werden
	Bei <u>Neueinführung einer Norm im Anwenderlabor</u> muss gemäß <b>ISO 16140-3 validiert</b> werden	Bei <u>Neueinführung im Anwenderlabor</u> muss gemäß <b>Anhang F der ISO 16140-3 validiert</b> werden
Nach Übergangszeitraum  <b>(ab 01.01.2028)</b>	Bei <u>Neueinführung / Re-Validierung einer Norm</u> muss Anwenderlabor <b>validieren gemäß ISO 16140-3</b>	<u>Neueinführung oder Änderungen</u> erheblicher Art „ <i>major technical changes</i> “ einer Norm <u>ohne Validierung</u> ist nicht mehr möglich

\* z. B. neue Reagenzien, Primer, Inkubationsbedingungen, wenn sie einen relevanten Einfluss auf das Messergebnis haben (analog zu Änderungen erheblicher Art („*major changes*“) bei Normüberarbeitungen)

### **3 Auffassung der ALTS- Sachverständigen zur Mitberücksichtigung der Kompetenz akkreditierter Anwenderlabors**

Nach ISO 16140-3 erfordert die Verifizierung von neu in den Anwendungsbereich aufgenommenen Methoden die Untersuchung einer Vielzahl von Leistungsmerkmalen und Matrizes. Sie berücksichtigt allerdings nur das Matrixspektrum des Anwenderlabors, nicht aber dessen bereits durch andere qualitätssichernde Maßnahmen und Leistungsdaten nachgewiesene Kompetenz.

Nach Auffassung der ALTS-Sachverständigen kann der Umfang der Verifizierungsmaßnahmen in akkreditierten Labors unter bestimmten Voraussetzungen reduziert werden.

### 3.1 Voraussetzungen für eine Reduzierung

- Bei neu einzuführenden Normen umfasst deren Anwendungsbereich die **für das Labor relevanten Lebensmittelgruppen**. In den entsprechenden Normverfahren müssen zu den relevanten Lebensmittelkategorien Validierungsdaten bzw. Leistungsmerkmale vorliegen.
- Die Leistungsfähigkeit des Labors (z. B. Prüfverfahren, Ausstattung, Eignung und Erfahrung der Mitarbeiter, verwendete Nährmedien) wird durch **regelmäßige erfolgreiche Teilnahme an Eignungsprüfungen** sowie interne und externe Audits kontinuierlich bestätigt.
- Jede **Mediencharge** wird in Anlehnung an ISO 11133 auf ihre Zuverlässigkeit und Leistungsfähigkeit **geprüft**.
- Bei quantitativen Verfahren kann die laborinterne **Vergleichspräzision  $S_{IR}$**  im Rahmen der Bestimmung der technischen Unsicherheit als Komponente der Messunsicherheit nach ISO 19036 **erfasst** werden.

### 3.2 Möglichkeiten für eine Reduzierung bzw. Vereinfachung

#### 3.2.1 Allgemeine Reduzierungsmöglichkeiten

##### a) Lebensmittelkategorien

Die zugrunde gelegte **Kategorisierung der Lebensmittel** in 15 Gruppen mit weiteren Kategorien für Futtermittel, Umgebungsproben sowie Proben aus der Primärproduktion ist als übersichtliche Gliederung zu begrüßen, erscheint aber als Grundlage für die Festlegung von Untersuchungsumfängen als nicht zweckmäßig. So ist z. B. aus mikrobiologischer Sicht eine Unterteilung in Fleisch (rotes Fleisch) und Geflügelfleisch nicht erforderlich, da in beiden Matrices mit denselben Pathogenen und Verderbsorganismen zu rechnen ist und ein ähnliches Milieu herrscht. Deshalb werden begründete Modifikationen der Kategorisierung nach ISO 16140-3 aus fachlicher Sicht als vertretbar eingestuft.

Insbesondere bei Referenzverfahren mit einem „*breiten Spektrum von Lebensmitteln*“ wurden im Rahmen der Validierung sowie z. B. bei Studien oder Eignungsprüfungen der Referenzlaboratorien umfangreiche Untersuchungen zur Eignung der verwendeten Medien und Testverfahren für verschiedene Probenmatrices geprüft und damit die zuverlässige Anwendbarkeit sichergestellt.

Damit ist nach Auffassung der ALTS-Sachverständigen eine erneute umfassende Prüfung vieler Matrices im Rahmen der Verifizierung verzichtbar.

Nur wenn bestimmte Matrices besondere Prüfbedingungen erforderlich machen, sollten entsprechende aussagekräftige Matrices mitberücksichtigt werden.

##### b) Bestätigungen von Mikroorganismen in künstlich kontaminierten Proben

Nach Auffassung der ALTS-Sachverständigen ist keine vollständige **Durchführung aller Bestätigungsschritte** erforderlich, wenn Probenmaterial vorliegt, das nur definierte Zielkeime und diese ausschließlich in den künstlich kontaminierten (dotierten) Versuchsansätzen enthält. Bei ausreichender Abgrenzungsmöglichkeit zu Nichtzielkeimen liegt es im Ermessen des Laborverantwortlichen, den Umfang von Bestätigungsreaktionen zu reduzieren.

##### c) Verifizierungsumfang bei der Änderung von im Labor validierten/verifizierten Prüfmethoden

Betrifft die Änderung im Prüfverfahren nur einzelne Arbeitsschritte, z. B. in der Differenzierung, kann sich die Re-Verifizierung auf diese Arbeitsschritte beschränken.

#### 3.2.2 Reduzierungs-/Vereinfachungsmöglichkeiten für qualitative Prüfverfahren

##### a) Bestimmung von $eLOD_{50}$

Für qualitative Prüfverfahren sieht die ISO 16140-3 sowohl für die Implementierung des Verfahrens als auch für die Verifizierung der Lebensmitteleinheit die Bestimmung des  $eLOD_{50}$  vor. Bei Anwendung eines Prüfverfahrens mit **eingeschränktem Anwendungsspektrum** von Lebensmitteln oder einer Ergänzung des Anwenderspektrums um eine Matrix reicht nach der Auffassung der ALTS-Sachverständigen die einmalige Bestimmung des  $eLOD_{50}$ . Da die Auswirkungen unterschiedlicher Matrices im Rahmen der Validierung bereits umfangreich geprüft wurden, reicht zur Verifizierung eines Verfahrens mit **breitem Anwendungsspektrum** die Bestimmung des  $eLOD_{50}$  an zwei verschiedenen Matrices (davon eine anspruchsvoll) i. d. R. aus.

- b) Vorgehen bei fehlenden Validierungsdaten oder der Angabe „nicht auswertbar“ für die ausgewählte Matrix

Falls für eine zur Verifizierung vorgesehene spezifische Matrix keine oder „nicht auswertbare“ Validierungsdaten zum  $LOD_{50}$  vorhanden sind, sieht die ISO 16140-3 die Verwendung von 1 KbE/Probe als Standardvorgabe für den  $LOD_{50}$  vor.

Sofern  $LOD_{50}$ -Validierungsdaten für vergleichbare validierte Matrix-/Erreger-kombinationen vorliegen und diese deutlich mehr als 1 KbE/Probe aufweisen, kann bei entsprechender Begründung auch für die Matrix ohne Validierungsdaten ein vergleichbarer  $LOD_{50}$ -Wert von  $> 1$  KbE herangezogen werden.

### 3.2.3 Reduzierungsmöglichkeiten für quantitative Prüfverfahren

- a) Bestimmung der laborinternen Vergleichstandardabweichung  $S_{IR}$

Das Labor kann die laborinterne Vergleichstandardabweichung  $S_{IR}$  zur Bestimmung der technischen Unsicherheit nach ISO 19036 oder im Rahmen der Methodenverifizierung durchführen (siehe ISO 16140-3 Pkt. 6.1.1).

- b) Verwendung verschiedener Nährmedienchargen

Wenn jede Nährmediencharge in Anlehnung an ISO 11133 geprüft wird, ist es nicht notwendig, bei der Bestimmung der laborinternen Vergleichstandardabweichung  $S_{IR}$  Nährmedien verschiedener Chargen einzusetzen.

- c) Bestimmung der geschätzten systematischen Abweichung (eBias)

Hierfür sieht die ISO 16140-3 die Verwendung von drei Beimpfungsniveaus sowie für jedes der drei Beimpfungsniveaus vorzugsweise eine andere Laborprobe/Charge derselben Matrix vor. Aufgrund der umfangreichen Datenlage aus entsprechenden Validierungsuntersuchungen, kann die Verifizierungsuntersuchung nach Auffassung der ALTS-Sachverständigen auf eine Laborprobe/Charge mit drei Beimpfungsniveaus reduziert werden.

- d) In der Regel dürfte die Verifizierung an einer für das Labor relevanten Matrix ausreichen (zumal für quantitative Verfahren der Verdünnungseffekt den Einfluss durch die Matrix weitgehend reduziert).

## 4 Begriffsbestimmungen

- $eLOD_{50}$  = geschätzte Nachweisgrenze mit 50 % Nachweiswahrscheinlichkeit:  
Den  $LOD_{50}$  ist in ISO 16140-1 in Pkt. 2.35 beschrieben. Danach ist z. B. den  $LOD_{50}$  die Nachweisgrenze, bei der 50 % der Versuche zu einem positiven Ergebnis führen.
- LIL (= low inoculation level) ist das niedrigste der 3 verwendeten Kontaminations-niveaus für die qualitative Verifizierung, welches für die Bestimmung des  $LOD_{50}$  der jeweiligen Matrix verwendet wird.
- eBias = geschätzte systematische Abweichung für die Lebensmittelmatrix:



Hier wird bei dem zu prüfenden Verfahren die systematische Differenz der ermittelten Keimzahlen der künstlich kontaminierten Matrix und der Keimsuspension ohne Matrix errechnet.

- $S_{IR}$  = die laborinterne Vergleichsstandardabweichung ist die Standardabweichung von Prüfergebnissen, welche unter Intra-Laborvergleichbedingungen gewonnen wurde. Die voneinander unabhängigen Prüfergebnisse werden durch Anwendung desselben Verfahrens an identischen Prüfmaterialien (Laborprobe) im selben Labor durch verschiedene Personen mit verschiedenen Geräteausrüstungen erzielt.

## 5 Durchführung der Verifizierung qualitativer und quantitativer Verfahren

### 5.1 Durchführung für qualitative Verfahren

#### 5.1.1 Analyse der Validierungsdaten

Hierbei sind folgende Informationen zu bewerten:

1. Sind im Normverfahren Daten zur Validierung enthalten?
2. Sind Daten zum  $LOD_{50}$  (50%ige Nachweiswahrscheinlichkeit) angegeben?
3. Wurden für das Labor relevante Matrizes geprüft?
4. Welcher  $LOD_{50}$  wurde bei der Validierung bei welcher Lebensmittelmatrix erreicht?
5. Welche Keime wurden für die jeweiligen Beimpfungsversuche verwendet?

Hinweis: In älteren Normen können Angaben zum  $LOD_{50}$  fehlen und müssen durch die Arbeitsgremien während der Übergangsfrist bis 31.12.2027 noch ergänzt werden. Für den Fall, dass keine entsprechenden Validierungsdaten vorhanden sind, wird gemäß ISO 16140-3 Kap. 5.4.2 davon ausgegangen, dass der  $LOD_{50}$ -Wert für die gewählten Matrizes gleich oder niedriger als 1 KbE/Prüfmenge ist (vergl. Ausführungen in Kap. 3.2.2 b)).

#### 5.1.2 Erstellung eines Verifizierungsplans

##### Auswahl der Arbeitsvorschrift sowie der zu verifizierenden Matrizes und Prüfkeime

Kapitel 5.2 der ISO 16140-3 stellt drei alternative **Arbeitsvorschriften** für die Beimpfung und Bestimmung des  $LOD_{50}$  zur Auswahl. Die jeweils zu verwendende Probenanzahl ist hierbei abhängig von der Qualität der verwendeten Keimsuspensionen: Je größer die Unsicherheit des Erreichens des gewünschten Kontaminationsniveaus ist, desto mehr Prüfmengen müssen mit den Zielkeimen beimpft und untersucht werden.

Im Folgenden wird die Arbeitsvorschrift Nr. 1 zur Ermittlung des  $eLOD_{50}$  zugrunde gelegt, da das für Arbeitsvorschrift Nr. 3 erforderliche zielgenau eingestellte Referenzmaterial derzeit kommerziell nicht erhältlich ist, und Arbeitsvorschrift Nr. 2 nur verwendet wird, wenn die erste gewählte Arbeitsvorschrift (Nr. 1 oder Nr. 3) nicht wie erwartet funktioniert hat (Wiederholung der Untersuchung). Dem Laborverantwortlichen bleibt aber freigestellt, eine andere der beschriebenen Arbeitsvorschriften anzuwenden.

Für die ausgewählten Matrizes sollen nach Möglichkeit Daten aus der Validierungsstudie des Normverfahrens vorliegen und sie sollten im Labor häufig untersucht werden.

Werden im Anwenderlabor weitere Matrizes untersucht, die bekannt dafür sind, bei Anwendung des zu verifizierenden Prüfverfahrens anders zu reagieren (Beispiel: Gewürze, Schokolade, Ei), sollten auch diese in die Verifizierung einbezogen werden.

Grundsätzlich ist bei der Auswahl der **Matrizes** darauf zu achten, dass sie **nicht bereits auf natürlichem Weg mit dem Ziel-Mikroorganismus kontaminiert sind**.

**Als Zielkeime** für das Dotieren sollten Keime gewählt werden, welche die im Prüfverfahren beschriebenen Merkmale aufweisen. Besonders geeignet sind z. B. die zur Nährmedienprüfung

gemäß ISO 11133 verwendeten Stämme. Vorzugsweise sollten sie aus einer anerkannten Stammsammlung stammen.

#### Festlegung der Anzahl der Prüfmengen und Methodik für die Untersuchung

Die **Anzahl der Prüfmengen** ergibt sich aus Tabelle 3 der ISO 16140-3.

Arbeitsvorschrift 1 sieht danach vor, dass 10 Parallelproben herzustellen sind. Sie bestehen aus 9 mit den unterschiedlichen Keimniveaus beimpften Prüfmengen sowie aus **einer unbeimpften Negativkontrollprobe**.

#### Berechnen der Kontaminationsniveaus

Gemäß Arbeitsvorschrift 1 wird als **niedrigstes der 3 Kontaminationsniveaus** der in der Validierungsstudie für die jeweilige Matrix genannte **LOD<sub>50</sub>** verwendet.

Für das **mittlere Niveau** wird das Dreifache, für das **hohe Niveau** das Neunfache des LOD<sub>50</sub> verwendet.

Diese theoretischen Verdünnungsschritte können technisch wie folgt umgesetzt werden:

- Der **niedrigste Kontaminationslevel** für die entsprechende Matrix wird den Validierungsdaten der Norm entnommen (LOD<sub>50</sub>) bzw. als 1 KbE/Prüfmenge festgelegt (s. auch Punkt 3.2.2 b)).
- Dieser Wert wird mit dem **Faktor 9 multipliziert**, um das höchste Kontaminationsniveau zu ermitteln (LOD<sub>50</sub> x 9).
- Es wird die **initiale Keimsuspension (= höchstes Keimniveau)** hergestellt, die zur Beimpfung aller Prüfmengen mit dem höchsten Keimniveau dient (bei Arbeitsvorschrift Nr. 1 also eine Prüfmenge). Sie muss in ausreichendem Volumen hergestellt werden, um neben der **Beimpfung einer Prüfmenge** auch eine **Keimzahlbestimmung dieser Suspension** sowie die **1:3-Weiterverdünnung** auf das mittlere Niveau durchführen zu können.
- Mit der 1:3-weiterverdünnten Keimsuspension (= **mittleres Niveau**) werden **vier Prüfmengen** für das mittlere Niveau beimpft und erneut **1:3 weiterverdünnt, um das geringste Keimniveau zu erreichen**.
- Mit der so entstandenen 1:9 Verdünnung des höchsten Keimniveaus werden **vier Prüfmengen** des **geringsten Niveaus** beimpft.

Für die **Bestimmung der Keimzahl in der initialen Keimsuspension** wird ein nicht selektiver Agar verwendet.

### **5.1.3 technische Durchführung nach Arbeitsvorschrift 1**

Umsetzungsbeispiel: LOD<sub>50</sub> entspricht 1 KbE/Prüfmenge

**Initiale Keimsuspension 100 ml mit 9 x 1 KbE/ml**

=> **1 ml** für Beimpfung Prüfmenge **hohes Niveau (9 x 1 = 9 KbE)**

=> Für **Keimzahlbestimmung** 2 x 1 ml (auf je 3 Platten oder Guss) sowie 2 x 0,1 ml (Platten nicht selektiv + ggf. selektiv)

=> **3 ml** Ausgangssuspension + 6 ml Verdünnungsmedium **für 1:3 Verd.** (ergibt 9 ml)

=> 9 ml Suspension für mittleres Niveau (**1:3 Verdünnung** der Ausgangssuspension)

=> **4 x 1 ml** für Beimpfung Prüfmenge **mittleres Niveau (3 x 1 = 3 KbE)**

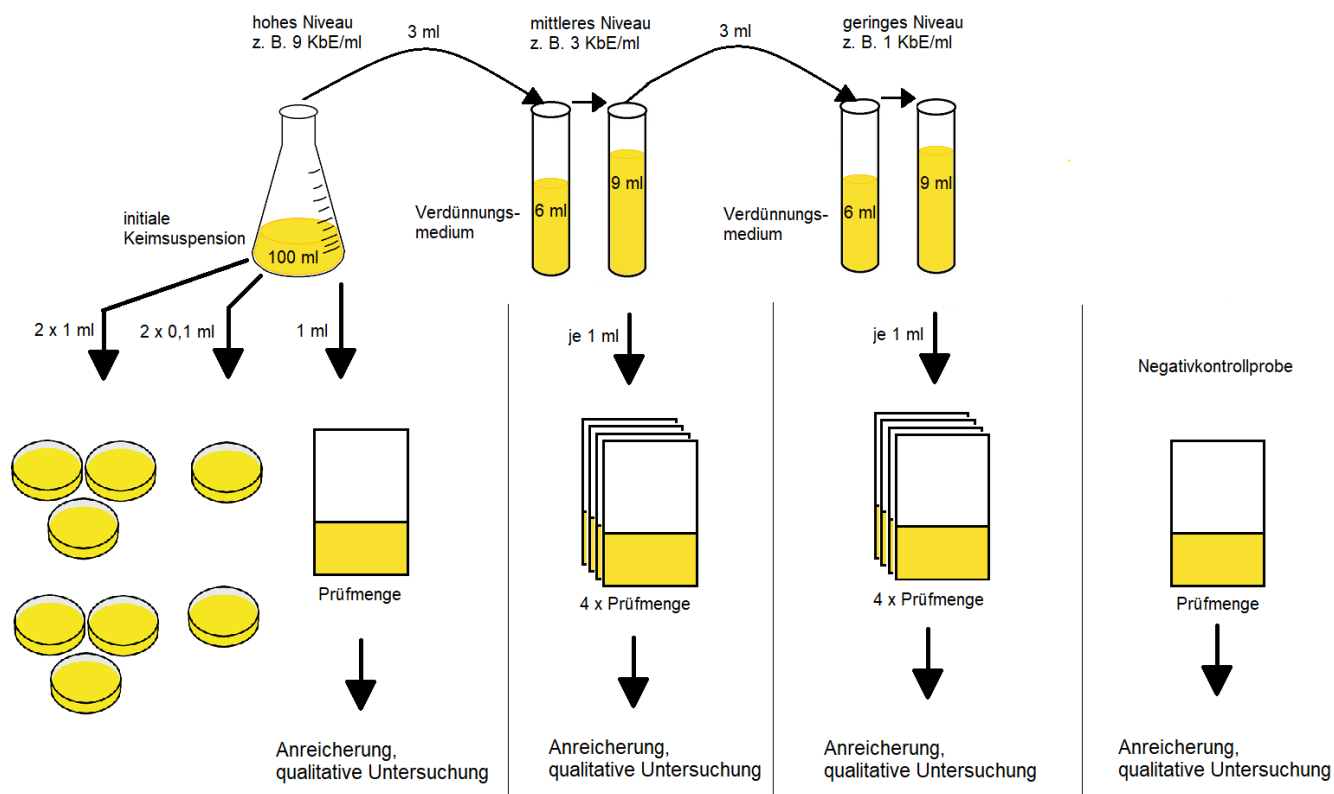
=> **3 ml** Ausgangssuspension + 6 ml Verdünnungsmedium **für 1:3 Verd.** (ergibt 9 ml)

=> 9 ml Suspension für geringstes Niveau (**1:9 Verdünnung** der Ausgangssuspension)

=> **4 x 1 ml** für Beimpfung Prüfmenge **geringstes Niveau (1 x 1 = 1 KbE)**

**zusätzlich eine Negativkontrollprobe (unbeimpft) mitführen**

Abbildung 1 zu Umsetzungsbeispiel:



**Für den Ergebnisbericht wird die Inokulationsdichte auf Grundlage der im höchsten Beimpfungsniveau durchgeführten Keimzahlbestimmung berechnet.** Die Angaben zu mittlerer und geringer Inokulationsdichte ergeben sich somit rechnerisch und werden nicht mittels Keimzahlbestimmung oder MPN-Verfahren ermittelt.

Wenn mit sehr unsicherem Keimgehalt in der verwendeten Ausgangs-Keimsuspension zu rechnen ist, kann die Treffsicherheit des Beimpfungsversuchs durch folgende Maßnahme erhöht werden: Aus einer ausreichend hohen Ausgangsverdünnung werden mehr als die zwei zur Auswertung benötigten 1:3-Folgeverdünnungen hergestellt. Mit jeder dieser Verdünnungsstufen werden je 4

Prüfmengen inokuliert, so dass nach Abschluss aller Untersuchungen und Bestimmung der Keimzahl der Ausgangsverdünnung diejenige Verdünnungsserie ausgewählt werden kann, deren geringster Keimlevel dem geforderten  $LOD_{50}$  am nächsten kommt. Eine genaue Beschreibung findet sich in Kap. 5.4.2 der Norm.

#### Herstellung der Inokula und Dotieren der Lebensmittelproben

Die **Probeneinwaage**, die mit den o. a. Inokula beimpft wird, richtet sich nach dem jeweiligen Prüfverfahren. I. d. R. ist von 10 g oder 25 g auszugehen. **Größere Einwaagen** als bei der Validierung der jeweiligen Norm verwendet wurden, können nicht für die Verifizierung eingesetzt werden; es muss in diesem Fall eine Validierung für diese Einwaagen erfolgen.

Für die angestrebten **Keimsuspensionen** können Übernachtskulturen mit McFarland 0,5 (ca.  $10^6$  bis  $10^7$  KbE/ml) nach entsprechender Verdünnung oder bereits eingestellte Keimsuspensionen, wie z. B. Gefrierstämmen aus der Nährmedienprüfung verwendet werden.

Bei Verwendung von Übernachtskulturen kann der zu erwartende Keimgehalt aufgrund von Erfahrungen bereits bekannt sein oder er muss durch eine Keimzählung vor Versuchsbeginn ermittelt werden.

Als Anhang 1 des Leitfadens wird eine Excel-Tabelle zur Berechnung des jeweiligen Volumen-/Keimdichte-Verhältnisses zur Verfügung gestellt.

Die beimpften Proben sowie die Negativkontrollprobe werden mit Hilfe des vollständigen Ablaufs des zu verifizierenden Verfahrens untersucht.

Dabei muss mindestens eine einzelne Prüfmenge in jedem Beimpfungsniveau mit positiven Ergebnissen bestätigt werden; die Anzahl der Kolonien zur Bestätigung darf dabei auf eine bestätigte Kolonie reduziert werden (die vollständige Bestätigungsreaktion kann reduziert werden, vergl. 3.2.1 b)).

Zusätzlich erfolgt die Berechnung der Keimzahl des Ausgangsinokulums, die für die Berechnung des „LIL“ benötigt wird (s. u.).

#### **5.1.4 Auswertung und Dokumentation mittels Verifizierungsbericht**

Für jeden Level wird die Anzahl der positiv getesteten Proben ermittelt. Dabei müssen folgende Bedingungen erfüllt werden:

- Die Negativkontrollprobe darf kein positives Ergebnis aufweisen (also Anzahl positive = 0)
- Die Probe mit hohem Kontaminationsniveau muss ein positives Ergebnis aufweisen, (also Anzahl positive = 1)
- Der mittlere und der geringe Level darf negative und positive Proben enthalten (also Anzahl positive zwischen „0“ und „4“)

Anhand der erhaltenen Zahlenkombination für die drei Kontaminationslevel und die Negativkontrolle wird mit Hilfe der Tabelle 6 der Norm der  $eLOD_{50}$  ermittelt, wobei als „LIL“ (*low inoculation level*) die berechnete Keimzahl im niedrigsten Beimpfungsniveau eingefügt wird (= Keimzahl des Ausgangsinokulums geteilt durch 9).

Der so bestimmte  $eLOD_{50}$  (ausgedrückt als KbE/Prüfmenge) wird nun mit dem  $LOD_{50}$  der entsprechenden Matrix aus der Validierungsstudie verglichen. Der  $eLOD_{50}$  darf das Vierfache des  $LOD_{50}$  aus der Validierungsstudie nicht überschreiten.

Wenn die Verifizierungsergebnisse dieser Zulässigkeitsgrenze nicht entsprechen ( $eLOD_{50} > 4 \times LOD_{50}$ ), wird eine Ursachenanalyse durchgeführt, die z. B. folgende Fehlermöglichkeiten berücksichtigt: Mangel an guter Laborpraxis, Beimpfungsfehler, Fehler durch besonders anspruchsvolles

Probenmaterial etc. Nach Identifizierung und Korrektur der erkannten Probleme wird die Verifizierungsuntersuchung wiederholt.

### Darstellung und Bewertung der erzielten Untersuchungsergebnisse und Leistungskriterien

Zum Abschluss der Verifizierung muss der Anwender bewerten und dokumentieren, dass das Labor die Leistungskriterien erfüllt und die erforderliche Kompetenz zur Durchführung der Untersuchung vorhanden ist.

Auf ihrer Homepage haben die Herausgeber der Norm Informationen und Arbeitshilfen zum Verifizierungsverfahren hinterlegt, darunter auch Excel-Tools zur Erfassung und Bewertung der Verifizierungs-Kenndaten (siehe auch Kapitel 6 - Literatur).

Auf Grundlage der dort veröffentlichten Hilfstabellen wurde von der ALTS-AG „Mikrobiologie und Hygiene“ ein Tool für die hier vorgestellte Arbeitsvorschrift 1 entwickelt, welches die Dokumentation der Planung und Durchführung (Verifizierungsplan) sowie die Ergebnisdarstellung und Bewertung der durchgeführten Verifizierung (Verifizierungsbericht) ermöglicht (siehe Anhang 2 des Leitfadens).

Entsprechende Excel-Tools für Arbeitsvorschriften 2 und 3 finden sich auf der Homepage des ISO SC9-Kommittes (siehe Kapitel 6 - Literatur).

## **5.2 Durchführung für quantitative Verfahren**

Die Verifizierung von quantitativen Verfahren besteht aus

- der Bestimmung der **laborinternen Vergleichstandardabweichung  $S_{IR}$**
- und
- der Bestimmung der **geschätzten systematischen Abweichung  $eBias$** .

### **5.2.1 Verifizierung der Implementierung - $S_{IR}$**

Die Verifizierung der Implementierung dient dazu, die Kompetenz des Anwenderlabors zur Durchführung des validierten Verfahrens darzustellen.

#### **5.2.1.1 Analyse der Validierungsdaten**

Die bei den Validierungsstudien ermittelten Validierungsdaten zur laborübergreifenden Vergleichstandardabweichung ( $S_R$ ) werden ermittelt und für den späteren Abgleich dokumentiert.

#### **5.2.1.2 Erstellung eines Verifizierungsplans**

Das Labor kann die laborinterne Vergleichstandardabweichung  $S_{IR}$  zur Bestimmung der technischen Unsicherheit nach ISO 19036 oder im Rahmen der Methodenverifizierung durchführen (s. Punkt 3.2.3 a)). Dies ist bei der Planung zu berücksichtigen.

Auf den Leitfaden Messunsicherheit Stand: 11-2021 der ALTS-Arbeitsgruppe wird hingewiesen.

#### **5.2.1.3 Erstellung eines Verifizierungsberichts**

Die Ergebnisse der Validierungsstudie zur  $S_R$  werden je Lebensmittelmatrix gemittelt und mit den für die  $S_{IR}$  ermittelten Werten verglichen und das Ergebnis abschließend bewertet (s. Tabelle 12 der ISO 16140-3).

Für die Verifizierung muss der Wert für die  $S_{IR}$  des verifizierten Verfahrens kleiner oder gleich 2 x dem niedrigsten Mittelwert sein, der aus den Werten für die  $S_R$  berechnet wurde. Wenn in der Validierungsuntersuchung nur ein  $S_R$ -Wert bestimmt wurde, muss die  $S_{IR}$  des verifizierten Verfahrens kleiner oder gleich 2 x  $S_R$  sein.

## **5.2.2 Verifizierung der Lebensmitteleinheit - geschätzte systematische Abweichung ( $eBias$ )**

Die Bestimmung der geschätzten systematischen Abweichung ( $eBias$ ) ist für die Verifizierung der Lebensmitteleinheit erforderlich.

### 5.2.2.1 Analyse der Validierungsdaten

Für diesen Leistungsparameter werden keine Validierungsdaten aus dem zu implementierenden Referenzverfahren benötigt, vielmehr gibt ISO 16140-3 die Vorgehensweise sowie eine fixe Zulässigkeitsgrenze für den eBias vor.

### 5.2.2.2 Erstellung eines Verifizierungsplans

#### Auswahl der Matrix

Der **Umfang der zu prüfenden Matrizes** kann in akkreditierten Labors unter bestimmten Voraussetzungen eingeschränkt und auf ein Mindestmaß begrenzt werden. Zum Beispiel kann berücksichtigt werden, dass viele Matrizes bereits im Rahmen der Validierung umfassend geprüft wurden und mikrobiologisch ähnliche Produkte zusammengefasst werden können (siehe Pkt. 3.2.3 c)).

Von den im Anwendungsbereich des Verfahrens beschriebenen Matrixgruppen **wird eine Matrix ausgewählt**, die im Labor häufig mit diesem Verfahren untersucht werden soll. Sollte es eine oder mehrere weitere Matrizes geben, die bekannt dafür sind, bei mikrobiologischen Verfahren anders zu reagieren (Beispiel: Gewürze, Schokolade, Ei), sollten auch diese in die Verifizierung einbezogen werden.

#### Auswahl des Zielkeims

**Als Zielkeim** für das Dotieren sollte ein Keim gewählt werden, der die im Prüfverfahren beschriebenen Merkmale aufweist. Besonders geeignet sind z. B. die zur Nährmedienprüfung gemäß ISO 11133 verwendeten Stämme. Vorzugsweise sollten sie aus einer anerkannten Stammsammlung stammen.

Bei der Untersuchung mehrerer Matrizes können je nach Prüfverfahren (z. B. *Enterobacteriaceae*) unterschiedliche Keime/Stämme für jede Matrix verwendet werden.

#### Auswahl der Beimpfungsniveaus

Die ausgesuchte Lebensmittelmatrix soll im Doppelansatz in 3 Keimstufen künstlich dotiert werden. Die Keimmengen in den Lebensmitteln sollen zwischen  $10^2$  und  $10^6$  KbE/ml oder KbE/g liegen bzw. in dem Keimbereich, der mit dem Prüfverfahren üblicherweise im Anwenderlabor bestimmt wird. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei den Inokula mit einer Schwankungsbreite von  $\pm 30\%$  zur ausgezählten Keimdichte der Suspension zu rechnen ist.

Anmerkung: Wenn mehr als drei Keimstufen verwendet werden, steigt die Wahrscheinlichkeit, die drei Niveaus zu erhalten, die für die Verifizierung erforderlich sind.

#### Auswahl der Prüfmengen

Für die Bewertung der Ergebnisse müssen die eingesetzten Matrixeinwaagen in der ersten Verdünnungsstufe berücksichtigt werden. In der Regel sind dies 10 g ausgehend von 10 g Einwaage + 90 ml Verdünnungslösung (oder 20 g + 180 ml).

#### Herstellung der Inokula

Eine angestrebte Keimmenge von z. B.  $10^2$ ,  $10^4$  und  $10^6$  KbE/ml oder KbE/g Lebensmittel kann durch eine Übernachtskultur und McFarland 0,5 (ca.  $10^6$  bis  $10^7$  KbE/ml) mit entsprechender Verdünnung oder aus einer eingestellten Keimsuspension zur Nährmedienprüfung mit einem Keimgehalt von ca.  $10^7$  KbE/ml gewonnen werden. Weitere Konzentrationen können durch dezimale Verdünnungen der Ausgangssuspension hergestellt werden.

#### Dotieren der Lebensmittelproben

Mindestens 6 Prüfmengen (Probe A-F s. u.) werden dezimal verdünnt und in diese Verdünnungen wird 1 ml in den gewünschten Konzentrationen dotiert.

Es werden alle Keimlevel im Doppelansatz dotiert (Level 1 in A+B, Level 2 in C+D, Level 3 in E+F).

Für jede unterschiedliche Charge an Probenmaterial wird eine Probe (Probe G, ggf. H) unbeimpft mit dem Prüfverfahren untersucht, um das Hintergrundkeimniveau zu bestimmen.

Außerdem wird die jeweilige zum Dotieren verwendete Keimsuspension auch ohne Lebensmittelzusatz untersucht.

### 5.2.2.3 Durchführung

Das zu verifizierende Verfahren wird gemäß Prüfvorschrift durchgeführt.

Insgesamt werden mindestens 7 Prüfmengen benötigt und 7 x das Prüfverfahren mit Matrix durchgeführt.

Zusätzlich muss der Keimgehalt der mindestens 3 Keimlevel ohne Matrix nach Vorgabe des Prüfverfahrens bestimmt werden.

Bei Bedarf erfolgt der Ansatz weiterer Keimlevel, jeweils 2x mit Matrix und einmal ohne. Werden mehrere Chargen der Probenmatrix verwendet, wird für jede dieser Chargen eine Negativkontrolle ohne Dotierung durchgeführt.

Niedriger Keimlevel 1	Mittlerer Keimlevel 2	Hoher Keimlevel 3	Negativkontrollprobe pro Probencharge
A Probe + Susp. B Probe + Susp.	C Probe + Susp. D Probe + Susp.	E Probe + Susp. F Probe + Susp.	G Probe. o. Susp. Ggf. H Probe o. Susp.
Nur Susp. nach PV	Nur Susp. nach PV	Nur Susp. nach PV	

Abkürzungen: Susp: = Keimsuspension, PV = Prüfverfahren, welches verifiziert werden soll

### 5.2.2.4 Dokumentation mittels Verifizierungsbericht

Die Durchführung, die Ergebnisse und die Bewertung werden dokumentiert.

#### Darstellung der erzielten Untersuchungsergebnisse und Berechnungen

Die Keimzahlen KbE/g aus jedem Beimpfungsniveau mit und ohne Probenmaterial (Suspension) werden gemäß Prüfverfahren ermittelt (Spalte I und V) und in  $\log_{10}$  (Spalte II und VI) umgerechnet. Aus den Doppeluntersuchungen je Level werden die Mittelwerte berechnet (Spalte III) und auf die tatsächlich eingesetzte Einwaage in der ersten Verdünnungsstufe (z. B. 10 g) umgerechnet (x 10) (Spalte IV).

Die Differenz der Ergebnisse mit (Spalte IV) und ohne (Spalte VI) Probenmaterial wird errechnet.

#### Beispiel:

		I	II	III	IV	V	VI	
Level	Probe	KbE/g LM + Susp.	In $\log_{10}$	Mittelwerte pro Level in $\log_{10}$	KbE/ Prüfmenge in $\log_{10}$ (hier 10 g)	KBE/ml Susp.	In $\log_{10}$	Differenz IV – VI
1	A	115	2,06	2,04	3,04	1250	3,1	-0,06
1	B	104	2,02					
2	C	12784	4,11	4,13	5,13	135000	5,1	-0,03
2	D	13654	4,14					
3	E	1246780	6,1	6,1	7,1	12890000	7,1	0
3	F	1227780	6,09					
0	G	< 10						
0	Ggf.H	< 10						

Bewertung, ob die erforderlichen Leistungskriterien erfüllt und die Anwenderkompetenz vorhanden ist

Die Differenz (= geschätzte systematische Abweichung eBias) sollte bei jedem Kontaminationsniveau nicht über  $0,5 \log_{10}$  liegen.

Wenn der eBias den angestrebten Wert von  $0,5 \log_{10}$  nicht überschreitet, gilt die **Verifizierung als erfolgreich durchgeführt**.

Diese Bewertung gilt, wenn die Untersuchung der Proben ohne Suspensionszusatz (G u. ggf. H) keinen Nachweis der gesuchten Keime ergeben hat. Wurden in den Negativkontrollproben Keimzahlen der gesuchten Keime nachgewiesen, so ist dies bei der Berechnung zu berücksichtigen. Sollte das Prüfverfahren für mikrobiologisch sehr unterschiedlich zu bewertende Matrizes eingesetzt werden, sollte die Bestimmung von eBias an einer weiteren Matrix durchgeführt werden.

Auf ihrer Homepage haben die Herausgeber der Norm ein Excel-Tool zur Erfassung und Bewertung des eBias veröffentlicht (siehe auch Kapitel 6 - Literatur). Eine übersetzte und mit weiteren Angaben ergänzte Tabelle ist diesem Leitfaden als Anhang 3 beigelegt. Sie kann für die Dokumentation des Verifizierungsplans und zur Berechnung des eBias verwendet werden.

### 5.3 Durchführung für alternative Bestätigungs- und Typisierungsverfahren

In diesem Leitfaden wird nur auf die Verifizierung und die möglichen Reduzierungen von qualitativen und quantitativen Verfahren eingegangen. Die weiteren Verfahren wie z. B. Bestätigungsreaktionen sind der ISO 16140-3 Kapitel 7 zu entnehmen.

## 6 Literatur

DIN EN ISO/IEC 17025:2018-03

Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2017); Deutsche und Englische Fassung EN ISO/IEC 17025:2017

DIN EN ISO 16140-3:2021-06

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

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 11133:2020-10

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

ALTS-Leitfaden zu DIN EN ISO 11133, Stand: 2015-05

Übergangszeit für die Umsetzung von ISO 16140-3, Version vom 19.01.2021

### Hilfsmaterialien der ISO

Diese Hilfsmaterialien sind auf der SC 9 Homepage verfügbar:

<https://committee.iso.org/sites/tc34sc9/home/essential-information/content-left-area/validation-of-methods/method-validation-and-method-ver.html>



- Excel-Tool: ISO\_16140-3\_2021\_Method\_verification\_Calculation\_tool\_version\_20210319.xlsx  
[https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/ISO\\_16140-3\\_2021\\_Method\\_verification\\_Calculation\\_tool\\_version\\_20210319.xlsx](https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/ISO_16140-3_2021_Method_verification_Calculation_tool_version_20210319.xlsx)
- Excel-calculation tool ISO 16140-3:2021 for assistance on statistics:  
<https://committee.iso.org/sites/tc34sc9/home/essential-information/content-left-area/validation-of-methods/method-validation-and-method-ver.html>
- Presentation: Overview of the ISO 16140 series – standards for validation and verification of microbiology methods:  
[https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/1%20Presentation\\_Overview\\_ISO\\_16140\\_series\\_20210322.pdf](https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/1%20Presentation_Overview_ISO_16140_series_20210322.pdf)
- Presentation: Overview of ISO 16140-3 ‘Method verification’ – improving confidence in laboratory results:
  - PDF: [https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/2%20Presentation\\_Overview\\_ISO\\_16140-3\\_Method\\_verification\\_20210322.pdf](https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/2%20Presentation_Overview_ISO_16140-3_Method_verification_20210322.pdf)
  - PowerPoint: [https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/2%20Presentation\\_Overview\\_ISO\\_16140-3\\_Method\\_verification\\_20210322.pptx](https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/2%20Presentation_Overview_ISO_16140-3_Method_verification_20210322.pptx)
- Presentation: “Deep dive” into ISO 16140-3 ‘Method verification’ – an extended training for improving confidence in laboratory results:
  - PDF: [https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/3%20Training\\_Deep\\_dive\\_ISO\\_16140-3\\_Method\\_verification%2020210322.pdf](https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/3%20Training_Deep_dive_ISO_16140-3_Method_verification%2020210322.pdf)
  - PowerPoint: [https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/3%20Training\\_Deep\\_dive\\_ISO\\_16140-3\\_Method\\_verification%2020210322.pptx](https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/3%20Training_Deep_dive_ISO_16140-3_Method_verification%2020210322.pptx)
- Recording of the Webinar on 2 March 2021: Publication ISO 16140-3 ‘Method verification’:  
<https://vimeo.com/522329760>

## Anhänge

*Disclaimer/Haftungsausschluss:*

*Die Anhänge wurden von der ALTS-AG erstellt. Für mögliche Fehler wird keine Haftung übernommen. Die Anhänge sind nur für den wissenschaftlichen Gebrauch im Anwenderlabor vorgesehen.*

Anhang 1: Rechen-Tool zur Einstellung des Keimgehaltes für die Inokulation von Prüfmengen

Anhang 2: Rechen- und Bewertungs-Tool für die Bestimmung des eLOD<sub>50</sub> nach Arbeitsvorschrift 1

Anhang 3: Rechen- und Bewertungs-Tool zur Verifizierung des Estimated Bias (eBias)