

### **Anmerkung zur Aktualität der ALTS-Beschlüsse:**

Der Arbeitskreis prüft regelmäßig die Aktualität seiner Beschlüsse auf ihre Aktualität.

Die aktuelle Übersicht der ALTS-Beschlüsse kann auf der BVL-Homepage ([https://www.bvl.bund.de/DE/Arbeitsbereiche/01\\_Lebensmittel/01\\_Aufgaben/02\\_AmtlicheLebensmittelueberwachung/12\\_ALS/Im\\_ALS\\_node.html](https://www.bvl.bund.de/DE/Arbeitsbereiche/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/12_ALS/Im_ALS_node.html)) eingesehen werden. Diese Übersicht wird im Anschluss an die ALTS-Arbeitstagungen fortführend aktualisiert.

## 89. Arbeitstagung des ALTS

Auf Grundlage von § 8 Nr. 4 der Geschäftsordnung veröffentlicht der Arbeitskreis der auf dem Gebiet der Lebensmittelhygiene und der Lebensmittel tierischer Herkunft tätigen Sachverständigen (ALTS) die auf der 89. Arbeitstagung vom 20. – 22. Juni 2022 in Berlin gefassten Beschlüsse.

### **2022/89/08 Prominente Abbildungen von Früchten in Verbindung mit der hervorgehobenen Angabe „ERDBEERE“ bzw. „BANANE“ im Hauptsichtfeld eines Milcherzeugnisses mit nur 0,1% Fruchtsaft**

#### **Sachverhalt/Frage**

Dürfen naturalistische Abbildungen von mehreren großen Früchten oder Fruchtbestandteilen sowie die hervorgehobene Angabe „ERDBEERE“ bzw. „BANANE“ im Hauptsichtfeld eines Milcherzeugnisses vorhanden sein, dessen Fruchtanteil nur aus 0,1 % Fruchtsaft besteht und das auf der Rückseite der Verpackung als „[Milcherzeugnis] mit Erdbeergeschmack“ bzw. „... mit Bananengeschmack“ deklariert ist?

#### **Beschluss**

Wenn bei einem Milcherzeugnis naturalistisch dargestellte Früchte im Hauptsichtfeld hervorgehoben abgebildet und keine relativierenden Angaben im selben Sichtfeld vorhanden sind, dass es sich lediglich um ein Erzeugnis mit Fruchtgeschmack handelt, wird der Verbraucher davon ausgehen, dass diese Früchte dem Milcherzeugnis zur Geschmacksgebung zugesetzt worden sind.

Wird der charakteristische Fruchtgeschmack nicht durch den minimalen Fruchtanteil (z. B. 0,1 % Erdbeersaft), sondern ausschließlich oder fast ausschließlich durch Aromen erzielt, ist eine blickfangartige naturalistische Abbildung von Früchten zur Irreführung im Sinne von Art. 7 Abs. 1 Buchst. a) Verordnung (EU) Nr. 1169/2011 geeignet.

Diese Irreführung kann durch einen ähnlich prominent dargestellten Hinweis in demselben Sichtfeld vermieden werden, durch den deutlich wird, dass es sich hier lediglich um ein Erzeugnis mit dem entsprechenden Fruchtgeschmack handelt.

## **2022/89/14 Bezeichnung „Kochschinken“ für Kochpökelerzeugnisse vom Hähnchen**

### **Sachverhalt/Frage**

In letzter Zeit fallen vermehrt Kochpökelerzeugnisse vom Hähnchen auf, die als „Hähnchen(koch)schinken“ bezeichnet werden.

Es stellen sich dabei die Fragen, ob „Kochschinken“ überhaupt eine Bezeichnung für ein Hähnchenkochpökelerzeugnis sein kann, und falls ja, welches Teilstück dafür Verwendung finden muss und wie in diesem Kontext zusammengefügte Erzeugnisse zu beurteilen sind.

### **Beschluss**

Der ALTS stellt fest, dass „Hähnchen(koch)schinken“ analog zum Putenschinken (LS-Nr. 2.3.10) aus der Hähnchenbrust hergestellt wird.

Da es sich bei Schinken um ein Erzeugnis gehobener Qualität handelt, ist die Herstellung von „Hähnchen(koch)schinken“ aus der Keule beim Huhn nicht üblich.

Die Bezeichnungen von zusammengeführten Erzeugnissen vom Hähnchen, die die Stückgrößenvorgaben von 80 Gew.-% > 100 g (gem. LS-Nr. 2.3.10 letzter Absatz) nicht einhalten, sind mit „... aus Fleischstücken zusammengefügt“ gem. Anh. VI Teil A Nr. 7 der VO (EU) Nr. 1169/2011 bzw. LS-Nr. 2.3.2.6 zu ergänzen.

Analog zu Schweinekochpökelerzeugnissen erfolgt auch bei „Hähnchen(koch)schinken“ kein Brätzusatz, der Gewebeverband ist im Wesentlichen intakt und der brätähnliche Anteil beträgt < 10 Vol.-% gem. LS-Nr. 1. 2.4 Absatz 1 und 2.

## **2022/89/16 Die neue DIN EN ISO 16140-3:2021: Änderungen bei der Verifizierung von Prüfverfahren; Erstellung eines Leitfadens durch die ALTS AG Hygiene und Mikrobiologie**

### **Sachverhalt/Frage**

Im Juni 2021 wurde Teil 3 der DIN EN ISO 16140-3 (Verifizierung von mikrobiologischen Methoden) veröffentlicht. Eine Verifizierung einer geänderten oder neu im Labor implementierten mikrobiologischen Methode ist danach auch für amtliche Labore mit hohem Aufwand verbunden, da die in akkreditierten Laboren geltenden hohen Qualitätsstandards nicht aufwandsmindernd berücksichtigt werden.

Die AG Hygiene und Mikrobiologie hat daher – wie in der 81. Arbeitstagung vorgetragen und vom Beschluss fassenden Gremium bestätigt – einen Leitfaden für amtliche Labore mit Mindestanforderungen und Hilfestellungen für die Durchführung der Verifizierung mikrobiologischer Methoden entwickelt.

### **Beschluss**

Der Leitfaden zur Anwendung der DIN EN ISO 16140-3:2021 in amtlichen Laboren (Anlage) wird unter den beschriebenen Bedingungen als ausreichende Vorgehensweise zur Verifizierung mikrobiologischer Methoden angesehen und zur Anwendung empfohlen.

Der Leitfaden wird zusätzlich auf der BVL-Homepage (inkl. der Hilfstabellen) veröffentlicht.

## **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**

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

Erstellung eines **Verifizierungsberichtes**

- o Darstellung der erzielten Untersuchungsergebnisse und Leistungsmerkmale
- o 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</u> einer <u>Norm im Anwenderlabor</u> muss gemäß <b>ISO 16140-3 validiert</b> werden	Bei <u>Neueinführung</u> <u>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</u> einer <u>Norm</u> muss Anwenderlabor <b>validieren gemäß ISO 16140-3</b>	<u>Neueinführung</u> oder <u>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<sub>50</sub>

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)**

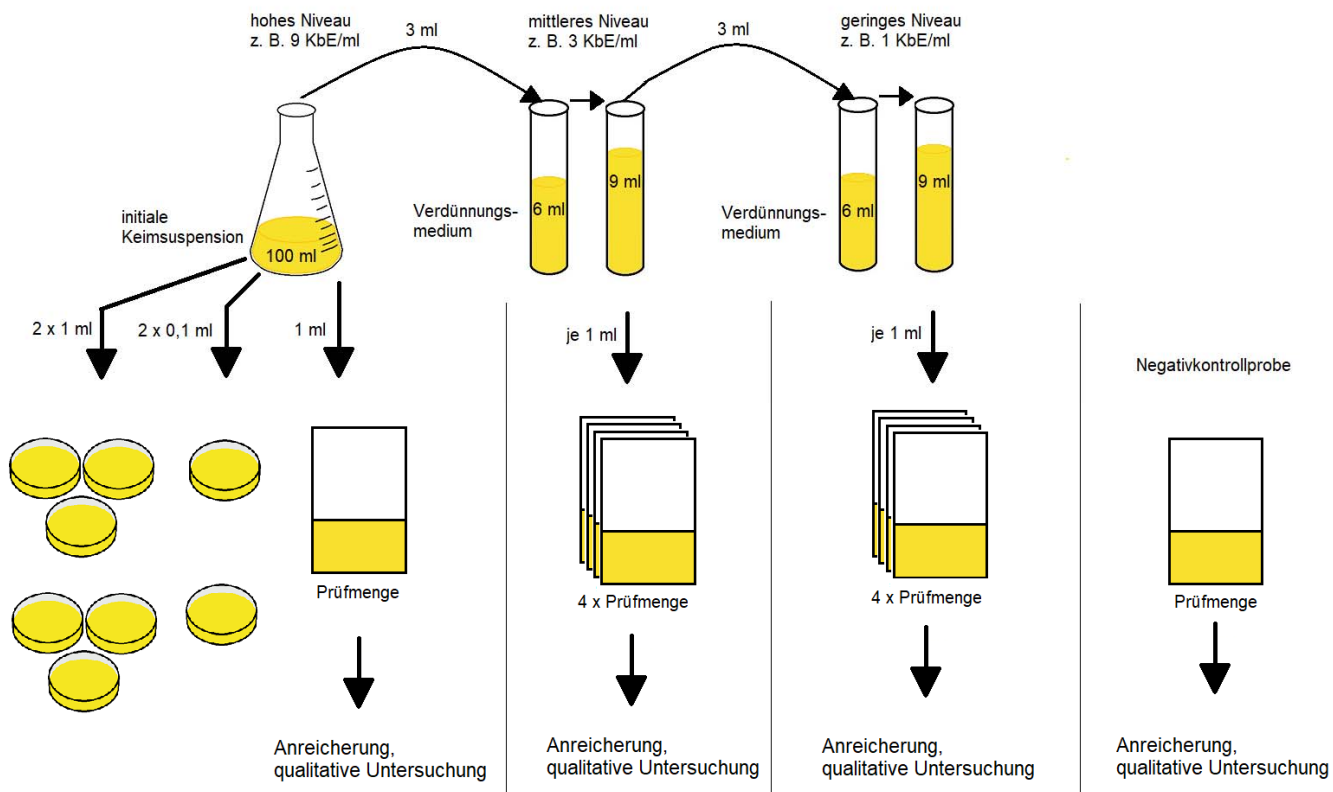
=> **3 ml** Ausgangssuspension + 6 ml Verdünnungsmedium **für 1:3 Verd.** (ergibt 9 ml)

=> 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 Beimpfungsstufen

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)

## **2022/89/17 Möglichkeiten zur Sicherstellung der Einhaltung der Bebrütungszeiten in der Mikrobiologie**

### **Sachverhalt/Frage**

Gemäß DIN EN ISO/IEC 17025:2018-03 muss das Laboratorium über ein Verfahren zur Überwachung der Validität der Ergebnisse verfügen.

Darunter fällt in der Mikrobiologie auch die Einhaltung der Bebrütungszeiten.

Die Diskussion innerhalb der ALTS-AG Hygiene und Mikrobiologie ergab unterschiedliche Vorgehensweisen, die auf ihre Eignung zur Überwachung der Bebrütungszeiten besprochen wurden.

### **Beschluss**

Der ALTS hält die vorgestellten Vorgehensweisen (siehe Anlage) zur Sicherstellung der Einhaltung der Bebrütungszeiten für geeignet.

## Einhaltung der Bebrütungszeit bei der mikrobiologischen Untersuchung

Lfd. Nr.	Bebrütungszeiten	Art der Kennzeichnung	Voraussetzung	Überprüfung	Dokumentation	Eignung zur Überwachung der Bebrütungszeit
1	Kennzeichnung mit Datum/Uhrzeit	Kennzeichnung jedes Nährmediums einer Probe mit Datum und genauer Zeitangabe (Beginn und/oder Ende Inkubation)	-	z.B. mittels elektronisch erzeugten Etiketten, mit hinterlegten oder selbst gekennzeichneten Bebrütungszeiten für jedes Nährmedium oder Zusammenfassung der unterschiedlichen Nährmedien mit Bebrütungsdauer inkl. Toleranzen (z.B. als Übersichtsliste)	Nicht erforderlich, wenn die Bebrütungszeiten eingehalten werden	ja
		Kennzeichnung der Plattenstapel, Töpfe, Ständer oder anderer Gestelle (flüssige Medien) mit Datum und genauer Zeitangabe (Beginn und/oder Ende Inkubation)	Einheitliche Nährmedien und einheitliches Nachweisverfahren pro Stapel/Topf/Ständer/Gestell			ja
		Der Bebrütungsbeginn wird auf dem Prüfplan der Probe notiert.	-	Die Nährmedien werden nach vorgeschriebenem Zeitfenstern ausgewertet. Listen zu den Bebrütungszeiten der einzelnen Medien sind verfügbar	ja	ja

Lfd. Nr.	Bebrütungszeiten	Art der Kennzeichnung	Voraussetzung	Überprüfung	Dokumentation	Eignung zur Überwachung der Bebrütungszeit
2	Festlegung von Zeitfenstern für Beginn und Ende der Bebrütungszeit	Ohne Kennzeichnung	Der Beginn der Inkubation ist jeden Tag immer zur gleichen Zeit und eine tageweise Trennung im Brutschrank ist gegeben. Verschiedene Nährmedien und Nachweisverfahren können unterschieden werden.	z.B. mittels Listen, in denen die unterschiedlichen Nährmedien mit Bebrütungsdauer inkl. Toleranzen enthalten sind	Nicht erforderlich, wenn die Bebrütungszeiten / Zeitfenster eingehalten werden	ja
		Kennzeichnung der Plattenstapel, Töpfe, Ständer oder anderer Gestelle (flüssige Medien) nach den entsprechenden Zeitfenstern	Einheitliche Nährmedien und einheitliches Nachweisverfahren pro Stapel/Topf/Ständer/ Gestell  Eine tageweise Trennung im Brutschrank ist gegeben			ja



## **2022/89/18 Empfehlung zur experimentellen Abschätzung der Messunsicherheit bei quantitativen mikrobiologischen Untersuchungsverfahren für Lebensmittel**

### **Sachverhalt/Frage**

Aufgrund der im Mai 2020 erschienenen DIN EN ISO 19036 (Feststellung von Messunsicherheiten (MU) bei quantitativen Bestimmungen) sah sich die ALTS-AG „Hygiene und Mikrobiologie“ veranlasst, den Abschlussbericht „Validierung mikrobiologischer Untersuchungsverfahren“ zur experimentellen Ermittlung der Messunsicherheit quantitativer mikrobiologischer Untersuchungsverfahren (veröffentlicht im Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit [J. Verbr. Lebensm. 4 (2009): Supplement 1:76-84], doi: 10.1007/s00003-009-0462-9) der aktuellen Normenlage anzupassen.

### **Beschluss**

Der Leitfaden „Empfehlung der ALTS-AG „Hygiene und Mikrobiologie“ zur experimentellen Ermittlung der Messunsicherheit quantitativer mikrobiologischer Untersuchungsverfahren für Lebensmittel“ (Anlage) wird zur Anwendung empfohlen.

Der Leitfaden wird zusätzlich auf der BVL-Homepage veröffentlicht.

**Empfehlung der ALTS-Arbeitsgruppe  
„Hygiene und Mikrobiologie“  
zur experimentellen Abschätzung der Messunsicherheit bei quantitativen  
mikrobiologischen Untersuchungsverfahren für Lebensmittel**

2. Version (November 2021)

Einleitung .....	3
<b>KAPITEL I EMPFEHLUNG ZUR ABSCHÄTZUNG DER MESSUNSICHERHEIT BEI QUANTITATIVEN MIKROBIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGSVERFAHREN .....</b>	<b>3</b>
<b>1 ANWENDUNGSBEREICH .....</b>	<b>3</b>
<b>2 BEGRIFFE .....</b>	<b>4</b>
2.1 Präzision .....	4
2.2 Wiederholpräzision ( $r$ ) .....	4
2.3 Vergleichpräzision ( $R$ ) .....	4
2.4 Richtigkeit .....	4
2.5 Messunsicherheit (MU) .....	4
2.6 Technische Unsicherheit .....	4
2.7 Matrixunsicherheit .....	4
2.8 Verteilungsunsicherheit .....	5
2.9 Standardunsicherheit ( $u$ ) .....	5
2.10 Erweiterte Unsicherheit ( $U$ ) .....	5
2.11 Laborinterne Vergleichsstandardabweichung ( $s_{IR}$ ) .....	5
2.12 Laborprobe .....	5
2.13 Untersuchungsprobe .....	5
2.14 Prüfmenge .....	5
<b>3 EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE MESSGENAUIGKEIT.....</b>	<b>6</b>
<b>4 ABSCHÄTZUNG DER MESSUNSICHERHEIT IN DER MIKROBIOLOGIE .....</b>	<b>6</b>
4.1 Technische Unsicherheit .....	7
4.1.1 Abschätzung aus Daten von Intra-Laborvergleichuntersuchungen .....	7
4.1.1.1 Durchführung .....	7
4.1.1.2 Auswahl der Probenmatrix .....	8
4.1.1.3 Beimpfen des Probenmaterials .....	8
4.1.1.4 Keimzahlbereich und Koloniezahlen .....	9
4.1.1.5 Auswertung und Bestätigung .....	9
4.1.1.6 Berechnen der Vergleichsstandardabweichung .....	9
4.2 Matrixunsicherheit .....	10
4.3 Verteilungsunsicherheit .....	10
4.4 Erweiterte Messunsicherheit .....	10
<b>5 ANGABE DER MESSUNSICHERHEIT IM PRÜFBERICHT .....</b>	<b>11</b>
<b>KAPITEL II INTERPRETATION VON MESSUNSICHERHEITEN BEI QUANTITATIVEN MIKROBIOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGSVERFAHREN.....</b>	<b>11</b>
<b>6 ÜBERLEGUNGEN ZUR BERÜCKSICHTIGUNG BEI DER BEURTEILUNG VON LEBENSMITTELN .....</b>	<b>11</b>

<b>7</b>	<b>BEWERTUNG DER PRÄZISIONSDATEN .....</b>	<b>12</b>
<b>8</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN .....</b>	<b>13</b>
<b>9</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>14</b>
<b>10</b>	<b>WEITERFÜHRENDE LITERATUR.....</b>	<b>14</b>
<b>ANHANG A</b>	<b>ABBILDUNGEN .....</b>	<b>16</b>
<b>ANHANG B</b>	<b>MITGLIEDERLISTE (STAND NOVEMBER 2021).....</b>	<b>17</b>

## **Einleitung**

Gemäß DIN EN ISO/IEC 17025:2018 müssen akkreditierte Prüflaboratorien über Verfahren für die Schätzung der Messunsicherheit (MU) verfügen und diese anwenden. Weiterhin sind nach dieser Norm Angaben zur geschätzten MU in Prüfberichten dann erforderlich, wenn sie für die Gültigkeit oder Anwendung der Prüfergebnisse von Bedeutung sind, wenn sie vom Kunden verlangt werden oder wenn die Unsicherheit die Einhaltung von vorgegebenen Grenzen in Frage stellt.

Vor diesem Hintergrund hatte die ALTS-Arbeitsgruppe „Validierung mikrobiologischer Untersuchungsverfahren“ im Jahr 2004 beschlossen, sich vorrangig mit dem Thema „Messunsicherheit mikrobiologischer Untersuchungsverfahren“ zu beschäftigen. In der Mikrobiologie werden Messunsicherheiten von Vergleichsstandardabweichungen abgeleitet, welche vorzugsweise in Intra-Laborvergleichuntersuchungen durch das Labor selbst ermittelt werden sollten. Deshalb wurden in den folgenden Jahren von den teilnehmenden Labors vergleichende experimentelle Untersuchungen durchgeführt, mit dem Ziel, eine Datensammlung anzulegen und Empfehlungen zur Abschätzung der MU zu erarbeiten. Nach Veröffentlichung der DIN EN ISO 19036:2020, Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Feststellung von Messunsicherheiten bei quantitativen Bestimmungen - hat die ALTS-Arbeitsgruppe „Hygiene und Mikrobiologie“ die im Jahr 2008 erstmals veröffentlichte Empfehlung der ALTS-Arbeitsgruppe „zur experimentellen Abschätzung der Messunsicherheit bei quantitativen mikrobiologischen Untersuchungsverfahren für Lebensmittel“ aktualisiert (Mitgliederliste siehe Anhang B). Nicht mitberücksichtigt wurden dabei die neu in die Norm aufgenommenen Anleitungen zur Bestimmung der MU bei Anwendung des MPN<sup>1</sup>-Verfahrens sowie anderer Verfahren (vergl. Anwendungsbereich der DIN EN ISO 19036:2020).

Die folgende Empfehlung der Arbeitsgruppe beinhaltet darüber hinaus im Kapitel II das Ergebnis der Diskussion zu der Frage, wie mit der MU bei der Beurteilung von Lebensmitteln im Hinblick auf deren mikrobiologische Beschaffenheit umzugehen ist. Sie beruht auf derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnissen und lebensmittelrechtlichen Vorgaben.

## **Kapitel I      Empfehlung zur Abschätzung der Messunsicherheit bei quantitativen mikrobiologischen Untersuchungsverfahren**

### **1      Anwendungsbereich**

Die Empfehlung richtet sich an Labors in Deutschland, welche amtliche Lebensmitteluntersuchungen durchführen. Sie dient als Hilfestellung bei der Abschätzung der MU von quantitativen mikrobiologischen Untersuchungsergebnissen sowie deren Angabe im Prüfbericht. Eine Verpflichtung zur Anwendung besteht nicht.

Die Empfehlung bezieht sich auf die quantitative kulturelle Bestimmung von Bakterien in Lebensmitteln mit Ausnahme des MPN-Verfahrens. Zu anderen Mikroorganismen (Viren, Parasiten), anderen Untersuchungsverfahren (z. B. molekularbiologische Verfahren, Impedimetrie) und anderen Probenmaterialien (z. B. Futtermittel) liegen der Arbeitsgruppe keine eigenen Erkenntnisse vor bzw. fallen diese nicht in den Anwendungsbereich der DIN EN ISO 19036:2020 (z.B. MU-Bestimmung in Wasser: vergl. ISO 29201).

---

<sup>1</sup> MPN: most probable number (Verfahren der wahrscheinlichsten Keimzahl)

## **2 Begriffe**

Für die Anwendung dieser Empfehlung gelten die folgenden Begriffe:

### **2.1 Präzision**

Gemäß DIN EN ISO 16140-1:2016 ist die Präzision der „Grad der Übereinstimmung zwischen angezeigten Werten oder gemessenen Größenwerten, die durch Wiederholungsmessungen an den gleichen oder ähnlichen Objekten unter festgelegten Bedingungen erhalten wurden“.

### **2.2 Wiederholpräzision (r)**

Gemäß DIN EN ISO 16140-1:2016 ist die Wiederholpräzision die „Präzision der Messung unter einer Reihe von Wiederholbedingungen der Messung (dasselbe Messverfahren, denselben Bearbeiter, dasselbe Messsystem, dieselben Betriebsbedingungen und denselben Ort sowie wiederholte Messungen an demselben Objekt oder an ähnlichen Objekten in kurzen Zeitabständen)“.

### **2.3 Vergleichpräzision (R)**

Gemäß DIN EN ISO 16140-1:2016 ist die Vergleichpräzision die „Präzision der Messung unter Vergleichbedingungen der Messung (unterschiedliche Orte, Bearbeiter, Messsysteme und wiederholte Messungen an demselben Objekt oder an ähnlichen Objekten)“.

### **2.4 Richtigkeit**

Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 ist die Richtigkeit das „Maß der Übereinstimmung zwischen dem Mittelwert einer unbegrenzten Anzahl von repliziert gemessenen Mengenwerten und einem Bezugsgrößenwert“ (Referenzmengenwert).

Anmerkung:

In der quantitativen Lebensmittel-Mikrobiologie sind Referenzmengenwerte normalerweise nicht verfügbar, so dass die systematische Abweichung von Messwerten (die quantitativ den Mangel an Richtigkeit ausdrückt) nicht zuverlässig geschätzt werden kann und nicht in der in diesem Dokument beschriebenen Schätzung der Unsicherheit enthalten ist (vergl. Einleitung der DIN EN ISO 19036:2020).

### **2.5 Messunsicherheit (MU)**

Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 ist die Messunsicherheit definiert als ein „dem Messergebnis zugeordneter Parameter, der die Streuung der Werte angibt, die vernünftigerweise der Messgröße zugeordnet werden könnte“.

Anmerkung:

Die MU steht allein für die Präzision einer Analyse, nicht aber für die Richtigkeit als zweite Komponente der Messgenauigkeit. Sie darf nicht zur Korrektur eines Messergebnisses verwendet werden.

### **2.6 Technische Unsicherheit**

Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 ist die technische Unsicherheit die „Unsicherheit, die aus der operationellen Variabilität resultiert, welche mit den technischen Schritten des Analyseverfahrens verbunden ist“.

Anmerkung:

Die technische Unsicherheit umfasst z. B. die Variabilitäten beim Einwiegen von Probenmaterialien, Pipettieren, beim Beimpfen und der Bebrütung von Medien sowie der Qualität der verwendeten Medienchargen.

### **2.7 Matrixunsicherheit**

Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 ist die Matrixunsicherheit die „Unsicherheit, die sich aus dem Ausmaß ergibt, in dem die Prüfmenge nicht wirklich repräsentativ für die Laborprobe ist“.

Anmerkung:

Als Matrixunsicherheit werden die Variationen der Kontaminationsgrade zwischen verschiedenen Prüfmengen einer Laborprobe bezeichnet. Sie kann vor allem bei festen und zusammengesetzten Matrices einen großen Einfluss auf das Messergebnis haben, sofern die Untersuchungsproben vor der Entnahme der Prüfmengen nicht ausreichend homogenisiert werden. Die Matrixunsicherheit wird für jeden Matrixtyp gesondert geschätzt und gilt für alle bei dieser Matrix angewendeten quantitativen Prüfverfahren, sofern von einer ähnlichen Verteilung der Mikroorganismen in der Matrix auszugehen ist.

## **2.8 Verteilungsunsicherheit**

Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 ist die Verteilungsunsicherheit die „Unsicherheit, die sich aus der intrinsischen Variabilität in Verbindung mit der Verteilung der Mikroorganismen in der Probe, der Erstverdünnung und den Folgeverdünnungen ergibt“.

Anmerkung:

Verteilungsunsicherheiten lassen sich auch durch sorgfältiges Homogenisieren der zu untersuchenden Materialien nicht ausschließen. Bei Koloniezählverfahren hängt die Verteilungsunsicherheit ab von der Zahl der gewachsenen bzw. bestätigten Kolonien.

## **2.9 Standardunsicherheit ( $u$ )**

Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 ist die Standardunsicherheit die „als Standardabweichung angegebene Unsicherheit eines Messergebnisses“.

## **2.10 Erweiterte Unsicherheit ( $U$ )**

Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 ist die erweiterte Unsicherheit (bzw. erweiterte Messunsicherheit) ein „Kennwert, der einen Bereich um das Messergebnis angibt, von dem erwartet werden kann, dass er einen großen Anteil der Verteilung der Werte umfasst, die der Messgröße vernünftigerweise zugeordnet werden könnten“.

## **2.11 Laborinterne Vergleichsstandardabweichung ( $s_{IR}$ )**

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.

## **2.12 Laborprobe**

Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 ist die Laborprobe die „Probe, die zum Versand an das Labor vorbereitet und zur Kontrolle oder Prüfung vorgesehen ist“.

## **2.13 Untersuchungsprobe**

Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 ist die Untersuchungsprobe die „aus der Laborprobe nach der im Prüfverfahren festgelegten Verfahrensweise hergestellte Probe, von der die Prüfmengen entnommen werden“.

## **2.14 Prüfmenge**

Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 ist die Prüfmenge die „aus einer Laborprobe entnommene und (nach Volumen oder Masse) gemessene repräsentative Probe, aus der die Erstverdünnung hergestellt wird“.

Weitere Erläuterungen von Begriffen finden sich in der jeweils gültigen Fassung der DIN EN ISO 19036.

### 3 Einflussfaktoren auf die Messgenauigkeit

Ein Labor sollte die angewandten Untersuchungsverfahren unter Kontrolle haben. Es muss belegen können, dass die ermittelten Ergebnisse nicht nur richtig, sondern auch präzise sind. Da in der Mikrobiologie der wahre Wert nicht verfügbar ist, lassen sich systematische Abweichungsfehler (bias) in mikrobiologischen Labors nicht vollständig ermitteln. Allerdings können Ergebnisse aus Inter-Laborvergleichuntersuchungen (Ringversuche, proficiency-Tests) einen Hinweis darauf geben, ob die erzielten Messergebnisse im Vergleich zum Mittelwert der von allen Labors ermittelten Ergebnisse richtig sind. Deshalb wird gemäß DIN EN ISO/IEC 17025:2018 von mikrobiologischen Labors erwartet, dass sie erfolgreich an Inter-Laborvergleichuntersuchungen teilnehmen. Zur Bewertung der Präzision müssen sie zusätzlich die MU ihrer quantitativen Verfahren abschätzen.

Auch die Probenentnahme und der Probentransport können große Fehlerquellen bezogen auf das analytische Endergebnis darstellen. Sie liegen jedoch in der Regel nicht im Verantwortungsbereich des Labors. Die experimentelle Abschätzung der MU beschränkt sich deshalb auf die Analyse des eingesandten Probenmaterials.

Eine wesentliche Quelle der MU kann das „sub-sampling“ im Labor sein, also die Entnahme von Probenmaterial zur Herstellung einer Erstverdünnung. Unsicherheiten bezogen auf das Messergebnis treten auch bei den weiteren Schritten der Analyse auf, wie Homogenisieren, Pipettieren, Bebrüten, Auszählen von Kolonien und Durchführen von Bestätigungsreaktionen. Die wichtigsten Einflussgrößen sind dabei die untersuchte Matrix, die durchführenden Personen, Umgebungsbedingungen, Zeitfaktoren, Geräte, Medien und Reagenzien.

### 4 Abschätzung der Messunsicherheit in der Mikrobiologie

Bei der Abschätzung der MU gemäß DIN EN ISO 19036:2020 werden folgende Unsicherheitskomponenten betrachtet:

- Technische Unsicherheit,
- Matrixunsicherheit und
- Verteilungsunsicherheit.

Wenn es mit den Kundenanforderungen vereinbar ist, reicht es zur Abschätzung der MU eines quantitativen mikrobiologischen Untersuchungsverfahrens aus, die zur Abschätzung der technischen Unsicherheit gemäß DIN EN ISO 19036:2020 ermittelte laborinterne Vergleichsstandardabweichung  $s_{IR}$  mit einem Erweiterungsfaktor ( $k=2$ ) zu multiplizieren. Das setzt aber voraus, dass die Untersuchungsproben vor der Entnahme der Prüfmenge mit technischen Geräten sorgfältig homogenisiert werden, um die Matrixunsicherheit so weit wie möglich zu reduzieren.

Andernfalls müssen die individuellen Matrixunsicherheiten gemäß DIN EN ISO 19036:2020 experimentell ermittelt werden, um zur Abschätzung der MU die technische Standardunsicherheit ( $u_{tech}$ ), die Standardunsicherheit der Matrix ( $u_{matrix}$ ) und die Verteilungsstandardunsicherheiten ( $u_{Poisson}$ ,  $u_{conf}$ ) kombinieren zu können.

Alternativ können auch für jede Matrix- oder Matrixgruppe<sup>2</sup> spezifische laborinterne Vergleichsstandardabweichungen experimentell ermittelt werden, welche dann alle wesentlichen Unsicherheitskomponenten beinhalten und zur Abschätzung der Messunsicherheiten mit einem Erweiterungsfaktor ( $k=2$ ) multipliziert werden.

---

<sup>2</sup> Eine Einteilung in Matrixgruppen ist beispielsweise anhand des Zerkleinerungsgrades des Probenmaterials möglich, zum Beispiel in pulverförmige und flüssige Lebensmittel, gründlich zerkleinerte feste Lebensmittel, feste kleinteilige und andere feste Lebensmittel. Durch gründliches Zerkleinern und Mischen im Rahmen der Probenaufarbeitung können alle festen Lebensmittel der gleichen Matrixgruppe angehören.

#### **4.1 Technische Unsicherheit**

Die technische Unsicherheit hat bei der quantitativen Bestimmung von Mikroorganismen in der Regel den größten Einfluss auf das Messergebnis. DIN EN ISO 19036:2020 schlägt drei alternative Möglichkeiten für die Schätzung der Vergleichsstandardabweichung zur Bestimmung der technischen Unsicherheit in absteigender Rangfolge vor:

1. Laborinterne Vergleichsstandardabweichung, d.h. Schätzung der Vergleichspräzision innerhalb eines Laboratoriums
2. Ableitung der Vergleichspräzision aus den Ergebnissen eines Ringversuchs zur Verfahrensvalidierung
3. Ableitung der Vergleichspräzision aus den Ergebnissen eines Ringversuchs zur Eignungsprüfung

Zu 1: Die technische Unsicherheit wird vorzugsweise aus einer Vergleichsstandardabweichung des Endergebnisses des Messprozesses geschätzt, welche gemäß Vorgaben der DIN EN ISO 19036:2020 durch vergleichende Untersuchung von homogenisierten Proben aus Routine-Einsendungen oder Eignungsprüfungen laborintern experimentell ermittelt wird.

Zu 2: Wird ein Verfahren verwendet, welches mittels einer Eignungsprüfung validiert wurde, kann auch die durch die Auswertung der Eignungsprüfung ermittelte Vergleichsstandardabweichung für die Schätzung der technischen Messunsicherheit verwendet werden, sofern die laborintern ermittelten Werte für die Wiederholpräzision und die Vergleichspräzision nicht höher sind als die der Eignungsprüfung.

Zu 3: Auch die im Rahmen einer erfolgreichen Teilnahme an einer Eignungsprüfung ermittelte laborübergreifende Vergleichspräzision darf zur Schätzung der MU verwendet werden, wenn von allen Teilnehmer-Laboren dasselbe Verfahren verwendet wurde. Allerdings kann die technische Unsicherheit unterschätzt werden, wenn die Versuchspläne der Eignungsprüfungen sehr stark von den Routineanalysen abweichen (z. B. bei der Herstellung der Erstverdünnung, fehlende Begleitflora).

##### **4.1.1 Abschätzung aus Daten von Intra-Laborvergleichsuntersuchungen**

International wird die Abschätzung der MU aus den Vergleichsstandardabweichungen favorisiert, welche in Intra-Laborvergleichsuntersuchungen durch das Labor selbst ermittelt werden. Die Höhe der abgeschätzten MU ist ein Maß für die Streuung der Ergebnisse, welche mit dem geprüften quantitativen Untersuchungsverfahren bei einer bestimmten Probenmatrix oder -matrixgruppe in dem betreffenden Labor ermittelt werden. Sie ist somit auch auf Routineproben übertragbar. Sie kann in verschiedenen Labors jedoch unterschiedlich groß sein. Systematische Abweichungsfehler können bei diesen Untersuchungen allerdings nicht erkannt werden.

Die laborinternen Vergleichsstandardabweichungen sollten für jedes im Labor angewandte quantitative Untersuchungsverfahren und für jeden Zielkeim (bzw. Keimgruppe) ermittelt werden. Werden Untersuchungsverfahren innerhalb eines Labors in verschiedenen Modifikationen durchgeführt, z.B. hinsichtlich der Beimpfungsmethode oder der Anzahl der beimpften Parallelplatten, ist die laborinterne Vergleichsstandardabweichung für jede Modifikation separat experimentell zu ermitteln. Eine Wiederholung der Experimente ist notwendig, sofern sich die Untersuchungsbedingungen innerhalb des Labors ändern (neue Methode, neue Medien, neue Geräte, neues Personal).

##### **4.1.1.1 Durchführung**

Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 sollten je Prüfverfahren mindestens 10 homogenisierte Proben von zwei verschiedenen Personen gemäß der laboreigenen Prüfvorschrift parallel aufgearbeitet werden, so dass für jede Probe zwei Keimzahlen erhalten werden<sup>3</sup>. Es sollte darauf geachtet werden, dass die Untersuchungsbedingungen (Einwaage der Prüfmenge und Herstellung der

---

<sup>3</sup> Falls in einem Labor nur eine Person praktisch tätig ist, kann zur Prüfung auf Präzision ersatzweise die Wiederholbarkeit ermittelt werden.



Erstverdünnung, Auswahl des Beimpfungsverfahrens und Anzahl beimpfter Parallelplatten) den Routinebedingungen entsprechen und für die Ermittlung der Vergleichsstandardabweichung nicht abgewandelt werden. Personen, Geräte und Medien sollten möglichst ebenso variabel eingesetzt werden, wie auch sonst üblich. Deshalb sollten auch unterschiedliche Chargen an Verbrauchsmaterialien zum Einsatz kommen. Ebenso sollte die Auswertung der bebrüteten Platten von den gleichen Personen erfolgen, die auch die Routineproben auswerten<sup>4</sup>.

#### 4.1.1.2 Auswahl der Probenmatrix

Da die Schätzung der  $s_{IR}$  so konzipiert ist, dass Beiträge durch die Heterogenität der Laborprobe ausgeschlossen werden, ist es nicht erforderlich die Schätzung für verschiedene Matrices zu wiederholen, sie kann auf Grundlage einer einzigen Matrix durchgeführt werden.

Die Auswahl der Matrix für Intra-Laborvergleichuntersuchungen richtet sich grundsätzlich nach den innerhalb des Labors routinemäßig untersuchten Probenmaterialien. Sofern für den Zielkeim mikrobiologische Grenzwerte in bestimmten Matrices vorliegen, welche vom Labor auch zur Beurteilung herangezogen werden, sollten auch diese Matrices für die experimentellen Untersuchungen ausgewählt werden.

Natürlich kontaminierte Proben sind bevorzugt auszuwählen, weil sie eine Abschätzung der MU unter realistischeren Bedingungen erlauben, als künstlich kontaminierte Proben. In der Regel sind dabei die Ergebnisse mehrerer Keimgruppen gleichzeitig auswertbar. Es ist nicht erforderlich, Laborproben mit unterschiedlichen Kontaminationsgraden zu berücksichtigen. Falls möglich sollten die Laborproben jedoch die natürlichen Schwankungen des Kontaminationsgrades abdecken. Für die Abschätzung der MU bei der quantitativen Bestimmung von Keimarten, die üblicherweise nur selten oder nur in sehr geringer Keimkonzentration in Lebensmitteln vorkommen (z.B. pathogene Keime), müssen Proben ggf. künstlich kontaminiert werden.

Es kann empfehlenswert sein, von Routineproben Material zurückzustellen und gekühlt bzw. tiefgekühlt zwischen zu lagern, um es bei Vorhandensein des Zielkeims im gewünschten Keimzahlbereich für vergleichende Untersuchungen zu verwenden. Um höhere Keimzahlen zu erhalten, können gering kontaminierte Proben vor der vergleichenden Untersuchung auch bei Raumtemperatur bzw. im Brutschrank gelagert werden.

Unter Umständen lässt sich auch das im Rahmen von Laborvergleichuntersuchungen verschickte Referenzmaterial einsetzen, sofern eine Vergleichbarkeit mit Routineproben gegeben ist. Wenn mehr als zwei Personen eines Labors an den Laborvergleichuntersuchungen teilgenommen haben, sollte die Auswahl der jeweiligen Keimzahlpaare im Zufallsverfahren erfolgen.

#### 4.1.1.3 Beimpfen des Probenmaterials

Steht keine ausreichende Anzahl natürlich kontaminierter Proben zur Verfügung, müssen ausgewählte Probenmaterialien mit den gewünschten Keimen vorzugsweise in unterschiedlichen Konzentrationen auf Stufe der jeweiligen Erstverdünnung künstlich kontaminiert werden. Verfahren für die Herstellung künstlich kontaminierter Lebensmittel sind in der DIN EN ISO 16140-3:2021 beschrieben. Das beimpfte Probenmaterial sollte in seiner Beschaffenheit weitestgehend natürlich kontaminierten Proben ähneln, auch in Bezug auf den physiologischen Zustand der eingeimpften Mikroorganismen.

Die Auswahl der Stämme richtet sich nach der jeweils zu prüfenden Methode und den Empfehlungen der Nährmedienhersteller. Es werden Stämme aus definierten Stammsammlungen (z. B. WDCM, ATCC, DSMZ) oder eindeutig biochemisch definierte Feldstämme eingesetzt.

---

<sup>4</sup> Werden Ergebnisse der beiden Messreihen unwillkürlich angeglichen, kann eine Codierung der Platten oder eine Auswertung durch verschiedene Personen nötig sein.

Insbesondere bei Verfahren mit Bestätigungsschritt sollte darauf geachtet werden, dass Lebensmittelmatrices mit einer hohen Hintergrundflora verwendet werden.

Nach eigenen Erfahrungen können die Erstverdünnungen mit Verdünnungen von frischen Bouillon-Kulturen beimpft werden. Nach 18-stündiger Bebrütung wird abhängig von Keimart, Stamm, Medium und Bebrütungstemperatur eine Keimkonzentration von  $10^7$  bis  $10^9$  Koloniebildenden Einheiten (KbE) pro Milliliter Bouillon erreicht. Der physiologische Zustand derart eingeimpfter Keime kann jedoch erheblich vom Zustand in Routineproben abweichen (z. B. gestresste Mikroorganismen in Trockenprodukten).

Der Keimgehalt der bebrüteten Bouillons verändert sich bei Kühlung über mehrere Tage in der Regel nur unwesentlich, so dass die Keimzahl auch vor Verwendung der Beimpfungs-Bouillon bestimmt werden kann bzw. eine wiederholte Verwendung möglich ist (Ausnahmen z.B. *Clostridium* spp., *Vibrio* spp.). Ergänzend wird dennoch eine nachträgliche Keimzahlbestimmung der Beimpfungs-Bouillon empfohlen.

Die Keimdichte kann auch anhand der optischen Dichte auf McFarland-Standard eingestellt werden. Dabei sollten die Herstellerangaben berücksichtigt und die Koloniezahlen vergleichend in einem Vorversuch bzw. vor Verwendung überprüft werden.

Jede der beiden Prüfmengen wird auf der Stufe der Erstverdünnung mit vorher festgelegten Mengen der jeweiligen bebrüteten und verdünnten Bouillons beimpft. Dabei ist auf eine gute Durchmischung der Bouillonkulturen und auf sorgfältiges Pipettieren zu achten, um zusätzliche Fehlerkomponenten klein zu halten. Bei flüssigen Probenmaterialien (z.B. Rohmilch) kann ggf. direkt beimpft werden. Jede Person arbeitet anschließend eine kontaminierte Erstverdünnung bzw. eine Prüfmenge der kontaminierten unverdünnten flüssigen Proben gemäß dem Routineverfahren auf.

#### **4.1.1.4 Keimzahlbereich und Koloniezahlen**

Eine experimentelle Abschätzung der MU für verschiedene Keimzahlbereiche ist nicht erforderlich, weil die Vergleichsstandardabweichung aus log-transformierten Keimzahlen berechnet wird. Dennoch ist es ratsam, innerhalb der Messreihe unterschiedlich hohe Keimzahlstufen anzustreben, um der Routine vergleichbare Bedingungen herzustellen. In jedem Fall sollten jene Stufen einbezogen werden, welche im Bereich von mikrobiologischen Grenzwerten liegen.

Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 sollten für die Berechnung der laborinternen Vergleichsstandardabweichung keine Proben verwendet werden, bei denen sich auf allen gültigen Platten pro Zählergebnis weniger als 30 (typische) Kolonien zählen lassen. Der Grenzwert von 30 Kolonien bezieht sich auf die Summe der Gesamtkoloniezahlen auf allen nach Auswertung gültigen Platten. Darüber hinaus sollte die Höchstzahl pro Platte, welche vom Untersuchungsverfahren abhängt, nicht überschritten werden.

#### **4.1.1.5 Auswertung und Bestätigung**

Die beimpften Platten werden nach der Bebrütung zeitgleich ausgewertet und die typischen Kolonien entsprechend der routinemäßig angewendeten Weise ausgezählt. Bei Bedarf wird eine bestimmte Anzahl typischer Kolonien mittels der Durchführung von Bestätigungsreaktionen nach laboreigener Prüfvorschrift weiter differenziert. Ausgehend von der Anzahl geprüfter und bestätigter Kolonien werden die jeweiligen Keimzahlen errechnet. Gemäß DIN EN ISO 19036:2020 sollten dabei alle Ergebnisse, für die weniger als die Hälfte der getesteten Kolonien bestätigt wurden, ausgeschlossen werden.

#### **4.1.1.6 Berechnen der Vergleichsstandardabweichung**

Die Keimzahlen werden als gewogene arithmetische Mittelwerte berechnet und anschließend logarithmiert. Die laborinterne Vergleichsstandardabweichung ( $s_{IR}$ ) wird nach der in der DIN EN ISO 19036:2020 genannten Formel berechnet. Für die DIN EN ISO 19036:2020 wird außerdem

ein verifiziertes Excel-Tool<sup>5</sup> zur Verfügung gestellt. Statt dieses Excel-Tools kann auch folgende Formel verwendet werden:

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{\sum(\log R_1 - \log R_2)^2}{2t}}$$

Dabei sind:

$s_{IR}$  = laborinterne Vergleichsstandardabweichung

t = Anzahl der Proben

$\log R_{1,2}$  = log-transformierte Keimzahlen der ersten bzw. zweiten Person

## 4.2 Matrixunsicherheit

Bei homogenen Flüssigkeiten und durch Einsatz technischer Geräte gut gemischten, homogenen Laborproben wird nur eine kleine Matrixunsicherheit erwartet und es kann ein fester (Mindest-)Wert ( $u_{\text{matrix}} = 0,1 \log_{10}$  KbE/g oder ml) verwendet werden. Andernfalls sind die verschiedenen Matrixunsicherheiten gemäß Vorgaben der DIN EN ISO 19036:2020 durch die Untersuchung von nicht homogenisierten natürlich kontaminierten Proben aus Routine-Einsendungen experimentell zu ermitteln. Von jeder Laborprobe derselben Matrix müssen dazu mindestens zwei Prüfmengen entnommen und unter Wiederholbedingungen<sup>6</sup> untersucht werden. Es können aber auch mindestens 11 Prüfmengen einer einzigen Laborprobe analysiert werden. Alternativ dürfen Werte verwendet werden, die von anderen Laboren experimentell ermittelt wurden, wenn ähnliche Matrixunsicherheiten erwartet werden. Allerdings ist davon auszugehen, dass experimentell ermittelte Matrixunsicherheiten überschätzt werden, weil sie auch die technische Unsicherheit und die durch die zufällige Verteilung von Mikroorganismen hervorgerufene Verteilungsunsicherheit beinhalten.

## 4.3 Verteilungsunsicherheit

Die Verteilungsunsicherheit ist bei Koloniezählverfahren unter anderem abhängig von der Gesamtzahl der gezählten Kolonien. Je niedriger diese Zahl ist, desto höher und bedeutsamer ist die sogenannte Poisson-Unsicherheit. Eine geringe Poisson-Unsicherheit kann vernachlässigt werden, wenn andere Unsicherheitskomponenten groß sind.

Bei einigen auf Koloniezählverfahren basierenden Verfahren wird eine Anzahl verdächtiger Kolonien mittels Bestätigungstests weiter untersucht und die Keimzahl je nach Ergebnis dieser Bestätigungsuntersuchungen entsprechend korrigiert. Die Größe der sogenannten Bestätigungsunsicherheit ist abhängig von den Anzahlen getesteter und bestätigter Kolonien.

Weitere Hinweise zur Abschätzung der Verteilungsunsicherheit sind der DIN EN ISO 19036:2020 zu entnehmen.

## 4.4 Erweiterte Messunsicherheit

Falls es aufgrund von Laborprotokollen oder Kundenwünschen erforderlich ist, die erweiterte Messunsicherheit auf Basis einer gemäß Vorgaben der DIN EN ISO 19036:2020 errechneten kombinierten Standardunsicherheit abzuschätzen, können verhältnismäßig geringfügige Unsicherheitskomponenten bei der Berechnung vernachlässigt werden. Beispielrechnungen können der DIN EN ISO 19036:2020 Kapitel 8 entnommen werden.

---

<sup>5</sup> Fundstelle: <https://committee.iso.org/sites/tc34sc9/home/general-standards/content-left-area/culture-media/iso-19036-estimation-of-measurment.html>

<sup>6</sup> Siehe Begriffsdefinitionen: „Wiederholpräzision“

## 5 Angabe der Messunsicherheit im Prüfbericht

Sofern nicht ausdrücklich vom Kunden verlangt, hält die ALTS-Arbeitsgruppe eine generelle Angabe der MU bzw. des Vertrauensbereichs im Prüfbericht in Zusammenhang mit dem erzielten Messergebnis für nicht erforderlich, auch dann nicht, wenn die ermittelten Keimzahlen im Bereich von mikrobiologischen Grenzwerten liegen.

Falls die MU im Prüfbericht angegeben wird, dann in derselben Einheit wie das Prüfergebnis.

Beispiele:

- $5,00 \pm 0,31 \log_{10} \text{KbE/g}$
- $5,00 \log_{10} \text{KbE/g}$  [4,69; 5,31]
- $1,0 \times 10^5 \text{KbE/g}$  [ $4,9 \times 10^4$ ;  $2,0 \times 10^5$ ]

Außerdem muss aus dem Prüfbericht hervorgehen, wie die MU geschätzt wurde (berücksichtigte Unsicherheitskomponenten, Erweiterungsfaktor).

Beispiel:

„Die angegebene erweiterte Messunsicherheit wurde in Übereinstimmung mit DIN EN ISO 19036:2020 geschätzt und basiert auf der kombinierten Standardunsicherheit, multipliziert mit einem Erweiterungsfaktor von  $k = 2$ , wodurch sich ein Vertrauensniveau von etwa 95 % ergibt. Die kombinierte Standardunsicherheit wurde gleich der experimentell ermittelten laborinternen Vergleichsstandardabweichung angenommen.“

## Kapitel II Interpretation von Messunsicherheiten bei quantitativen mikrobiologischen Untersuchungsverfahren

### 6 Überlegungen zur Berücksichtigung bei der Beurteilung von Lebensmitteln

Für eine zutreffende Interpretation eines mikrobiologischen Untersuchungsergebnisses im Hinblick auf eine lebensmittelrechtliche Bewertung muss beispielsweise festgelegt sein, ob sich die Bewertung auf die Probe selbst oder die zugehörige Charge bezieht. Bei der Beurteilung einer amtlichen Probe anhand eines mikrobiologischen Kriteriums muss darüber hinaus bekannt sein, ob bei der Festlegung mikrobiologischer Grenzwerte die Gesamtstreuung und damit die MU bereits berücksichtigt wurde, oder ob auf der Basis der MU ein Schätzintervall um das Analysenergebnis gebildet werden muss.

Bei der Schätzintervallbildung (s. Abbildung 1 in Anhang A) kann eine gesicherte Grenzwertüberschreitung nur festgestellt werden, wenn die Untergrenze des Schätzintervalls über dem Grenzwert liegt. Allerdings würde hierbei unter Umständen das Konsumentenrisiko außer Acht gelassen werden, welches bei Untersuchung einer einzelnen Probe statt mehreren Proben (üblicherweise  $n=5$ ) aus statistischen Gründen ohnehin schon erhöht ist<sup>7</sup>. Befindet sich die Obergrenze des Schätzintervalls unter dem Grenzwert, besteht andererseits mit großer Wahrscheinlichkeit kein Anlass zur Zurückweisung und eine Annahme kann ohne relevantes Irrtumsrisiko erfolgen. Schließt das Intervall den Grenzwert ein und zwar unabhängig davon, ob das Analysenergebnis selbst über oder unter dem Grenzwert liegt, sind weder Annahme noch Ablehnung gesichert. Befundinterpretation und ggf. einzuleitende Maßnahmen (z. B. Ziehung von Nachproben) müssen dann im Sinne einer Einzelfallprüfung sorgfältig überlegt werden.

Um die MU direkt bei der Festlegung eines „amtlichen“ Grenzwertes zu berücksichtigen, können von der zuständigen Stelle Methodenstreuungen herangezogen werden, wie sie aus nationalen und internationalen Ringversuchen bekannt sind. Akkreditierte Labors müssen ihre MU durch entsprechende Qualitätssicherungs-Maßnahmen ständig unter Kontrolle halten. Unter dieser Voraussetzung ist es durchaus plausibel und entspricht auch der gebräuchlichen Strategie, die MU bereits bei der Festlegung mikrobiologischer Grenzwerte zu berücksichtigen, statt jedes

---

<sup>7</sup> Wenn nur eine Probe einer Charge untersucht wird, ist die Wahrscheinlichkeit deutlich geringer, eine Grenzwertüberschreitung zu erkennen, als wenn mehrere Proben einer Charge untersucht werden.

Einzelergebnis individuell zu korrigieren. Dabei wird eine allgemein akzeptierte Toleranz für die Unsicherheit entweder auf den ursprünglichen Grenzwert von vornherein aufgeschlagen (established limits = z. B. bei Prozesshygienekriterien) oder von ihm abgezogen (absolute limits = z. B. bei Sicherheitskriterien). Diese Strategie erlaubt es, dass alle Beteiligten die mikrobiologischen Ergebnisse der innerbetrieblichen Eigenkontrolle wie auch der amtlich gezogenen Proben in gleicher Weise bewerten.

Sofern bei Drei-Klassen-Plänen<sup>8</sup> die Abstände zwischen  $m$  und  $M$  ausreichend groß sind (bei homogenen Lebensmitteln mindestens 0,5 Logstufen und bei heterogenen Lebensmitteln mindestens eine Logstufe) ist davon auszugehen, dass die MU bei der Festlegung der Grenzwerte bereits berücksichtigt wurde.

Eine besondere Situation entsteht, wenn die Grenzwerte auf nicht zu überschreitenden, toxikologisch oder infektionsmedizinisch begründeten Limits basieren, wie dies in der Regel bei der Festlegung von Sicherheitskriterien für pathogene Keime erfolgt, beispielsweise das in der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 festgelegte Lebensmittelsicherheitskriterium für *Listeria monocytogenes* ( $\leq 100$  KbE/g). Gemäß Vorsorgeprinzip muss hier das Konsumentenrisiko, mithin die Fehlentscheidungswahrscheinlichkeit, welche die fälschliche Annahme einer abzulehnenden Probe betrifft, minimiert werden. Es wäre bei einer Gesundheitsgefahr genau die falsche Strategie, erst dann Maßnahmen zu ergreifen, wenn die Grenzwertüberschreitung bei derartigen „absolute limits“ abgesichert ist, um den Produzenten vor unberechtigten Beanstandungen zu bewahren.

Hinsichtlich der Berücksichtigung der MU bei mikrobiologischen Grenzwerten ist die Diskussion auf internationaler Ebene noch nicht abgeschlossen. Aus dem Wortlaut der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 geht nicht hervor, wie diese methodisch bedingte Streuung bei der Beurteilung der untersuchten Einzelproben bzw. Chargen zu bewerten ist. Auch innerhalb der ALTS-Arbeitsgruppe besteht zu diesem Thema keine einheitliche Auffassung. Die Mehrzahl der Mitglieder geht allerdings davon aus, dass in einem gesetzlich festgelegten mikrobiologischen Kriterium die verfahrensbedingte Streuung bereits mitberücksichtigt ist, so dass jedes über einem Höchstwert ( $m$ ,  $M$ ) liegende Resultat immer eine Überschreitung desselben bedeutet. Daraus folgt, dass die MU bei der Aussage zur Konformität einer Probe im Hinblick auf festgelegte mikrobiologische Grenzwerte im Regelfall nicht berücksichtigt und in Prüfberichten nicht angegeben werden muss. Voraussetzung ist jedoch, dass das Labor die angewandten Untersuchungsverfahren auch hinsichtlich der Präzision unter Kontrolle hat und dass vom Gesetzgeber keine anderslautenden Beurteilungsempfehlungen gegeben werden.

## 7 Bewertung der Präzisionsdaten

Eine in der Entstehungsphase der vorangegangenen Leitfadenversion (2008) durchgeführte Datenabfrage unter den damals beteiligten Laboren ergab erweiterte Messunsicherheiten, die vorwiegend unter  $0,5 \log_{10}$  lagen. Dabei zeigte sich, dass auch Routineverfahren, wie das Tropfplatten-Verfahren und das Spiralplattenverfahren eine akzeptable Präzision aufweisen können. Größere Unterschiede zwischen den untersuchten Matrices (Hackfleisch, Räucherlachs, geschlagene Sahne, feine Backwaren, Feinkostsalate und Rohkostsalate) oder den geprüften Keimarten (aerobe Keimzahl, Milchsäurebakterien, Hefen, Enterobakteriaceen, Coliforme Keime und Pseudomonaden) ließen sich nicht feststellen.

---

<sup>8</sup> Drei-Klassen-Pläne umfassen üblicherweise für jede zu prüfende Lebensmittelmatrix und die zu überwachende Prozessstufe das zu ermittelnde Agens (Keim / Toxin), das anzuwendende Untersuchungsverfahren, die Zahl der Stichproben und deren Größe in Gramm oder Milliliter. Darüber hinaus werden Grenzwerte angegeben, unterhalb derer die Messergebnisse als akzeptabel ( $m$ ) bzw. oberhalb derer sie als inakzeptabel ( $M$ ) angesehen werden. Ergänzend enthalten Drei-Klassen-Pläne eine Annahmezahl ( $c$ ), welche die Anzahl der Einzelstichproben in der Gesamtstichprobe angibt, die zwischen  $m$  und  $M$  liegen dürfen. Als unbefriedigend werden Chargen angesehen, deren mittlere Keimzahl oberhalb von  $m$  angesiedelt ist bzw. wenn Einzelergebnisse oberhalb von  $M$  liegen.

Bei der quantitativen Untersuchung von Proben auf pathogene Erreger (*Listeria monocytogenes*, *S. aureus*), welche auf der Stufe der Erstverdünnung künstlich kontaminiert worden waren, lagen die ermittelten erweiterten Messunsicherheiten sogar deutlich darunter (bis zu  $0,3 \log_{10}$ ). Allerdings können die Untersuchung von natürlich kontaminierten Proben, die Durchführung von Bestätigungsreaktionen und das anschließende Rückrechnen der Keimzahlen unter Routinebedingungen zu größeren Streuungen zwischen den Keimzahlen führen.

Eine erneute Abfrage im Jahr 2021 konnte die damalige Datenlage bestätigen. Unabhängig davon muss jedes Anwenderlabor nach heutigen Maßstäben unter Berücksichtigung der Leistungsdaten mikrobiologischer Nachweisverfahren seine Kompetenz belegen. Die Vorgehensweise ist in der DIN EN ISO 16140-3 "Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz- und validierten alternativen Verfahren in einem Einzel-Labor" beschrieben. Dies beinhaltet grundsätzlich auch die Abschätzung der MU auf Basis der DIN EN ISO 19036:2020. Für alle Normverfahren, die nach wie vor keine Leistungsdaten vorgeben, ist wiederum gemäß DIN EN ISO 16140-3 zu verfahren.

## 8 Schlussfolgerungen

Wie alle Analysenergebnisse sind auch die Resultate mikrobiologischer Keimzählverfahren mit Messunsicherheiten behaftet. Diese Methodenstreuung gilt es in Betracht zu ziehen, wenn die quantitativen Untersuchungsergebnisse in Bezug zu Grenzwerten gesetzt und beurteilt werden. Bei einer solchen Bewertung kann als Alternative die Streuung entweder in Form eines Schätzintervalls in jedes Einzelergebnis eingehen oder der Grenzwert selbst enthält von vornherein einen Ab- oder Zuschlag für die MU.

Die im Rahmen der ALTS-Arbeitsgruppe durchgeführten vergleichenden experimentellen Untersuchungen zur Abschätzung der MU bei der Bestimmung von apathogenen Keimen unter Verwendung von natürlich kontaminierten Proben haben gezeigt, dass sich von den Labors bei den geprüften Keimarten (aerobe Keimzahl, Milchsäurebakterien, Hefen, Enterobakteriaceen, Coliforme Keime und Pseudomonaden) in der Regel erweiterte Messunsicherheiten von  $\leq 0,5 \log$  erzielen lassen. Die ermittelten erweiterten Messunsicherheiten bei der Bestimmung von pathogenen Keimen werden hingegen sehr stark von der Art der Beimpfung des Probenmaterials und von der Auswertung der bebrüteten Nährmedien beeinflusst.

Zur Frage, ob in einem mikrobiologischen Grenzwert die MU bereits berücksichtigt ist, kann die ALTS-Arbeitsgruppe keine allgemein gültige Empfehlung abgeben. Grundsätzlich wäre es sinnvoll, wenn diese Entscheidung bereits bei der Festlegung von mikrobiologischen Kriterien auch im Hinblick auf das anzuwendende Untersuchungsverfahren getroffen werden würde. Ob dies auf die derzeit gültigen Grenzwerte zutrifft, ist zumindest nicht veröffentlicht. Die Mehrzahl der Mitglieder geht allerdings davon aus, dass in einem gesetzlich festgelegten mikrobiologischen Kriterium die verfahrensbedingte Streuung bereits mitberücksichtigt ist, so dass jedes über einem Höchstwert ( $m$ ,  $M$ ) liegende Resultat immer eine Überschreitung desselben bedeutet. Voraussetzung ist jedoch, dass das Labor die angewandten Untersuchungsverfahren auch hinsichtlich der verfahrensbedingten Streuungen unter Kontrolle hat und dass vom Gesetzgeber keine anderslautenden Beurteilungsempfehlungen gegeben werden.

Um zu belegen, dass Anwenderlabore verfahrensbedingte Streuungen unter Kontrolle haben, können sie sich an der Vorgehensweise gemäß der DIN EN ISO-Normreihe 16140 (insbesondere Teil 3) in Verbindung mit der DIN EN ISO 19036:2020 orientieren.

## 9 Literatur

DIN EN ISO/IEC 17025:2018, 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 19036:2020, Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Feststellung von Messunsicherheiten bei quantitativen Bestimmungen (ISO 19036:2019); Deutsche Fassung EN ISO 19036:2019

Guide on measurement uncertainty for the enumeration of *Listeria monocytogenes* Version 1 – 26 March 2009; Marie CORNU & Bertrand LOMBARD, CRL *L. monocytogenes*  
<https://sitesv2.anses.fr/en/system/files/LIS-Cr-201014G.pdf>

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel, (ABl. Nr. L 338 vom 22.12.2005 S. 1; ber. Nr. L 278 vom 10.10.2006 S. 32, zuletzt geändert durch Art. 1 VO (EU) 2020/205 vom 14.2.2020 (ABl. L 43 S. 63))

## 10 Weiterführende Literatur

Corry, J., B. Jarvis, S. Passmore and A. Hedges (2007): A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food micro-organisms.  
*Food Microbiology* 24, 230-253

DIN EN ISO 7218:2007, Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen, Deutsches Institut für Normung, Beuth Verlag

DIN EN ISO 16140-1 bis -6: Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Verfahrensvalidierung, Deutsches Institut für Normung, Beuth Verlag

Forster, L. I. (2003): Measurement Uncertainty in Microbiology.  
*Journal of AOAC International*, 86 (5), 1089-1094

Hildebrandt, G. und H. Wichmann-Schauer (2005): Grenzwerte, Probenstreuung und Messungenauigkeit. Beurteilung mikrobiologischer Untersuchungsergebnisse aus amtlicher Sicht.  
*Fleischwirtschaft*, 85 (12), 111-114

Hübner, P., S. Gautsch und T. Jemmi (2002): In house-Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren.  
*Mitt. Lebensm. Hyg.* 93, 118-139

ISO 21748:2017, Leitfaden zur Verwendung der Schätzwerte der Wiederholpräzision, der Vergleichpräzision und der Richtigkeit beim Schätzen der Messunsicherheit

Lücke, F.-K., Goy, M., und U. Kurfürst (2004): Messunsicherheit bei der Bestimmung der „Gesamtkeimzahl“ von Hackfleisch mit der Impedanz-Methode.  
Tagungsband, 6. Fachsymposium der Fachgruppe Lebensmittelmikrobiologie der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Suhl, 10.-12. März 2004

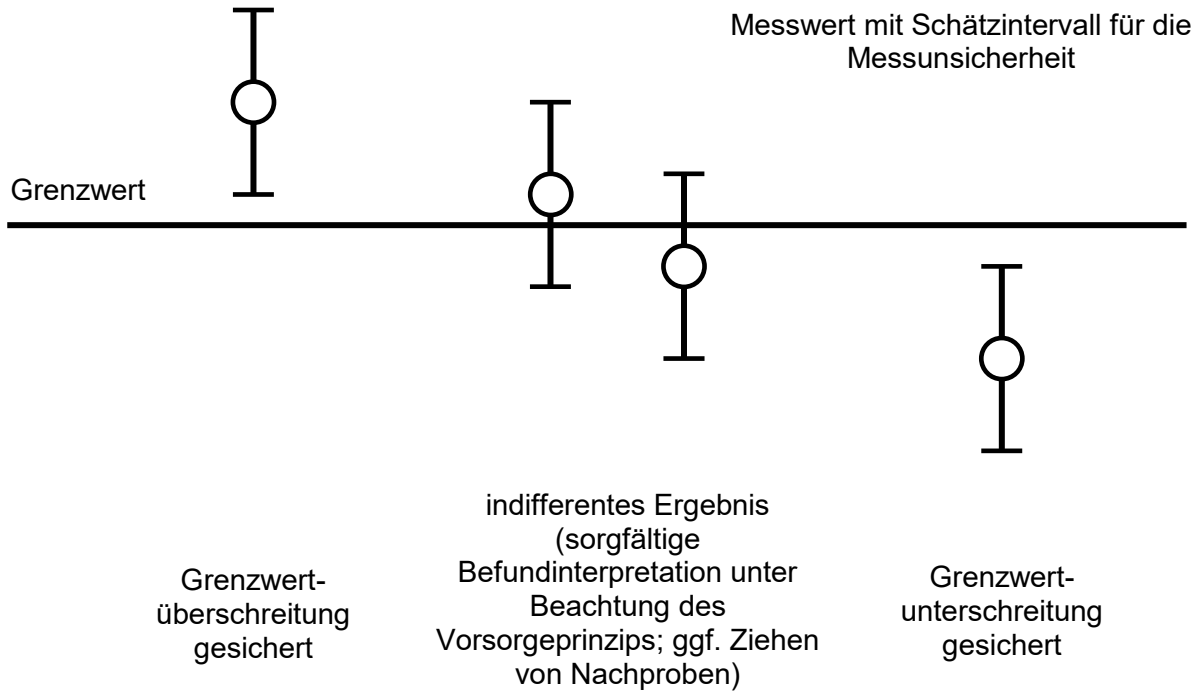
Niemelä, S.I. (2003): Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of micro-organisms.  
MIKES J4; <http://www.mikes.fi>

SAS-Dokument N 328: Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie (Ausgabe Februar 2006, Rev.1)



## Anhang A Abbildungen

**Abbildung 1: Beurteilung von mikrobiologischen Analysenergebnissen nahe eines festgelegten Grenzwertes unter Berücksichtigung von Schätzintervallen auf der Basis der ermittelten Messunsicherheit**



## **Anhang B Mitgliederliste (Stand November 2021)**

Leitung: Frau Dr. Schotte (CVUA Westfalen)

Mitglieder:

Frau Becker (LALLF M-V Rostock)

Frau Berges (LUA Bremen)

Frau Dr. Böhmer (CVUA Freiburg)

Herr Dr. Diepolder (LGL Bayern)

Frau Dr. Emmmler (Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr München)

Frau Dr. Freitag (LUA Rheinland-Pfalz)

Frau Dr. Fuchs (CVUA Karlsruhe)

Frau Dr. Hattendorf (LAV Saarland)

Frau Dr. Jahr (Landesamt für Verbraucherschutz Bad Langensalza)

Herr Dr. Lehmacher (Institut für Hygiene und Umwelt Hamburg)

Herr Louwers (Landeslabor Berlin-Brandenburg)

Frau Dr. Mauermann (LAVES, Lebensmittelinstitut Oldenburg)

Frau Dr. Messelhäuser (LGL Bayern)

Herr Dr. Neubert (LUA Sachsen)

Frau Dr. Steinhof (Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Standort Kassel)

Herr Dr. Trumpf (Landeslabor Schleswig-Holstein)

Frau Dr. Wicke (Landesamt für Verbraucherschutz in Halle)

Frau Dr. Zimmermann (LGL Bayern)

Ständiger Gast. Frau Dr. Wichmann-Schauer (BfR)

## **2022/89/19 Temperaturanforderungen an Sushi mit rohem Fisch, Krebs- und Weichtieren und/oder Teilen davon sowie Sashimi auf der Ebene des Einzelhandels**

### **Sachverhalt/Frage**

Die Temperaturvorgaben für die Lagerung von Sashimi und Sushi mit Verwendung von rohen Fischereierzeugnissen werden beim Lebensmittelunternehmer auf Einzelhandelsebene derzeit unterschiedlich ausgelegt, da sie aufgrund der Einordnung entweder als frisches oder als verarbeitetes (gesäuertes) Fischereierzeugnis betrachtet werden. Bei welcher Temperatur sind diese Erzeugnisse zu lagern?

### **Beschluss**

Bei Sushi mit einem Anteil an rohen Fischereierzeugnissen sowie bei Sashimi handelt es sich um sehr leicht verderbliche Lebensmittel, unabhängig davon, ob das Fischereierzeugnis frisch oder aufgetaut ist und unabhängig davon, ob (Sushi-)Reis mit oder ohne weitere pflanzliche Anteile sowie Essig an den tierischen Anteil gelegt wurde. Es findet in der Regel keine wesentliche Veränderung des ursprünglichen tierischen Anteiles statt. Es handelt sich hinsichtlich des Fischanteils somit nicht um Verarbeitungserzeugnisse.

Würde vorverpacktes Sushi/Sashimi unter Verwendung von frischen Fischereierzeugnissen hergestellt werden, wären Temperaturvorgaben gemäß Verordnung (EG) Nr. 853/2004 für alle Ebenen inklusive des Einzelhandels in Form einer Lagerung bei Temperaturen von schmelzendem Eis vorgegeben.

Für vorverpackte Sushi/Sashimi unter Verwendung von rohen, aufgetauten Fischereierzeugnissen hingegen werden in der Verordnung (EG) Nr. 853/2004 lediglich Temperaturanforderungen für die dem Einzelhandel vorgelagerten Stufen vorgegeben.

Aufgrund des Hygiene- und Gesundheitsrisikos in Verbindung mit dem hohen Bearbeitungs- und Zerkleinerungsgrad ist Sashimi/Sushi, welches unter Verwendung von aufgetauten rohen Fischereierzeugnissen hergestellt wird, unter fachlichen Gesichtspunkten genauso einzustufen wie ein frisches Fischereierzeugnis. Somit ist auch auf der Stufe des Einzelhandels bis zur Abgabe an den Endverbraucher eine Aufbewahrung dieser Erzeugnisse bei Temperaturen von schmelzendem Eis notwendig.

## **2022/89/26 QUID bei Fleischerzeugnissen, die unter Verwendung von Fleisch verschiedener Tierarten hergestellt werden**

### **Sachverhalt/Frage**

Bei einigen Geflügelwürsten, die unter Verwendung von Hühnerfleisch und Putenfleisch hergestellt wurden, sind die Anteile an Huhn und Pute zusammen angegeben (z. B. Geflügelfleischwurst; Zutaten: 70 % Geflügelfleisch (Hühnerfleisch, Putenfleisch)).

Gemäß Anhang VIII Nr. 3 der VO (EU) Nr. 1169/2011 (LMIV) erfolgt die Angabe der Menge einer Zutat oder Zutatengruppe als Prozentsatz der Menge der Zutat bzw. Zutatengruppe zum Zeitpunkt ihrer Verwendung. Gemäß der Bekanntmachung der Kommission zur Anwendung des Prinzips der mengenmäßigen Angabe von Lebensmittelzutaten (Quid) vom 21.11.2017 Nr. 2 Punkt 7. (2017/C 393/05) ist die QUID-Angabe i. S. von Art. 22 Abs. 1 Buchst. a) der VO (EU) Nr. 1169/2011 ebenfalls erforderlich, wenn in der Bezeichnung des Lebensmittels die Zutatengruppe genannt wird, wie etwa in „Gemüsepastete“, „Fischstäbchen“, „Nussbrot“ oder „Obstkuchen“. In diesen Fällen sollte sich die QUID auf den Gesamtgehalt an Gemüse, Fisch, Nüssen bzw. Obst beziehen.

Daraus ergibt sich, dass die Mengenangabe von Zutatengruppen einer in der Bezeichnung genannten Klasse, beispielsweise bei Geflügelfleischwurst die Menge an Geflügelfleisch insgesamt angegeben werden kann, wenn Huhn und Pute verarbeitet worden sind. Ähnliches dürfte auch für Erzeugnisse aus Wildfleisch gelten (z. B. kann bei einer Wildpastete, die aus Hirsch- und Wildschweinfleisch hergestellt wurde, die Summe an Hirsch- und Wildschweinfleisch angegeben werden).

### **Beschluss**

Sofern bei nicht expliziter Nennung einer Tierart in der Bezeichnung lediglich ein zusammenfassender Begriff wie z. B. „Wild“ oder „Geflügel“ genannt, genügt die zusammengefasste Mengenangabe für die jeweilige Zutatengruppe (z. B. X % Wildfleisch bzw. X % Geflügelfleisch) den rechtlichen Anforderungen zur Mengenkennzeichnung gemäß Anhang VIII Nr. 3 der VO (EU) Nr. 1169/2011.

*Dieser Beschluss (2022/89/26) ersetzt den Beschluss 2006/59/36.*

## **2022/89/27 Maschinelle Restfleischgewinnung von Kehlkopf und Trachea**

### **Sachverhalt/Frage**

Von einer Überwachungsbehörde wurde festgestellt, dass mit der für die Separatorenfleischgewinnung üblichen Technologie von ganzen Kehlköpfen mit Anteilen an Trachea eine „Fleischmasse“ gewonnen wurde, die ohne weitere Angaben als Verarbeitungsfleisch in den Verkehr gebracht wurde. Diese Gewinnungstechnologie wurde untersagt, da das derart gewonnene „Fleisch“ Knorpelanteile von Kehlkopf und Trachea enthielt. Man sah hier einen Verstoß gegen hygienerechtliche Bestimmungen, da der Lebensmittelunternehmer gemäß VO (EG) Nr. 853/2004 Anhang III Abschnitt VI Nr. 1 Buchstabe c sicherstellen muss, dass u. a. Knorpel des Kehlkopfes und der Trachea nicht für die Herstellung von Fleischerzeugnissen verwendet werden. Außerdem enthält diese „Fleischmasse“ Schleimhautanteile, deren Verarbeitung zu Fleischerzeugnissen nicht der Verkehrsauffassung entspricht. Die von der Behörde verfügten Maßnahmen wurden gerichtlich bestätigt (rechtskräftiges Urteil des VG Lüneburg vom 14. März 2013, Az. 6A 41/10).

In diesem Fall wird „Fleisch“ auf maschinelle Weise von Knorpeln gewonnen. Der Hersteller geht daher davon aus, dass es sich nicht um Separatorenfleisch handelt, da Separatorenfleisch definitionsgemäß vom Knochen gewonnen wird.

### **Beschluss**

Fleisch, das auf dieselbe Art und Weise wie Separatorenfleisch statt von Knochen von Kehlkopf und Trachea gewonnen wurde, darf auf Grund der enthaltenen Knorpelanteile nicht zu Fleischerzeugnissen verarbeitet werden (vgl. Anhang III Abschnitt VI Nr. 1 Buchst. c) der VO (EG) Nr. 853/2004).

Auch wegen der enthaltenen Schleimhaut wird derart gewonnenes Fleisch üblicherweise nicht zu Fleischerzeugnissen verarbeitet (LS-Nr. 1.2.7).

*Dieser Beschluss (2022/89/27) ersetzt den Beschluss 2011/67/25.*

## **2022/89/28 Auftauhinweis bei aus tiefgefroren gelagertem Rohschinken – Ausgangsmaterial hergestellten „Rohschinkenwürfeln“**

### **Sachverhalt/Frage**

Unterliegen aus tiefgefroren gelagerten Rohschinkenabschnitten geschnittene Schinkenwürfel der Verpflichtung zur Ergänzung der Bezeichnung mit dem Hinweis „aufgetaut“ im Sinne des Art. 17 Abs. 5 i. V. m. Anhang VI Teil A Nr. 2 der VO (EU) Nr. 1169/2011 (LMIV)?

### **Beschluss**

Werden Schinkenabschnitte zur Herstellung von Schinkenwürfeln tiefgefroren gelagert, ist mit einer Qualitätsminderung zu rechnen. Die daraus in gefrorenem Zustand geschnittenen Schinkenwürfel sind wenn sie gekühlt und fertig verpackt in Verkehr gebracht werden, mit dem Hinweis „aufgetaut“ zur Ergänzung der Bezeichnung gemäß Art. 17 Abs. 5 i. V. mit Anhang VI Teil A Nr. 2 der VO (EU) Nr. 1169/2011 zu versehen.

*Dieser Beschluss (2022/89/28) ersetzt den Beschluss 2011/68/19.*

## 2022/89/29 „...mett nach Art einer Frischen Zwiebelmettwurst“ – Abgrenzung von Mett zu frischer Mettwurst/Zwiebelmettwurst

### Sachverhalt/Frage

Ist die Bezeichnung „...mett nach Art einer Frischen Zwiebelmettwurst“ im Sinne des Art. 17 Abs. 1 VO (EU) Nr. 1169/2011 (LMIV) hinreichend genau, um zu erkennen welches Erzeugnis vorliegt?

In der Bezeichnung wird auf zwei unterschiedliche Erzeugnisse verwiesen, für die es jeweils eine eigenständige Verkehrsauffassung gibt. Die Bezeichnung „...Mett“ steht üblicherweise für ein zum Rohverzehr bestimmtes, ggf. mit Salz, Zwiebeln und Gewürzen „zubereitetes“ Schweinehackfleisch (vgl. Nr. 2.1.5.2 der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches). Dem gegenüber versteht man nach allgemeiner Verkehrsauffassung unter „Frische Zwiebelmettwurst“ eine streichfähige, umgerötete, gereifte und leicht gesäuerte frische Rohwurst mit ausgeprägter Reifungsflora und entsprechendem Rohwurstaroma (vgl. Nr. 2.4.1.2 der o. g. Leitsätze).

Kann der Verbraucher anhand der Bezeichnung „...mett nach Art einer Frischen Zwiebel-mettwurst“ erkennen, um was für ein Erzeugnis es sich handelt?

Ist ein Erzeugnis, welches aus Schweinehackfleisch besteht, gewürzt und gepökelt wurde als „Produkt eigener Art“ anzusehen und kann dieses gemäß VO (EU) Nr. 1333/2008 als nicht wärmebehandeltes Fleischerzeugnis (Kategorie 08.3.1) eingeordnet werden?

### Beschluss

1. Die gleichzeitige Verwendung der Bezeichnungen „...Mett“ (Nr. 2.1.5.2 der Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse) und „...mettwurst“ (Nr. 2.4.1.2.3 der o. g. Leitsätze), auch mit der Ergänzung „nach Art...“ ist widersprüchlich.
2. Die Bezeichnung „Mett“ für ein gepökelt Erzeugnis ist keine verkehrsübliche Bezeichnung.
3. Die Bezeichnung „Zwiebelmettwurst“ / „frische Mettwurst“ als Bezeichnung für eine leitsatzkonforme kurzgereifte Rohwurst setzt voraus, dass die folgenden Kriterien eingehalten sind<sup>1</sup>:
  - Geruch, Geschmack, (Abbindung) roh wurstartig
  - stabile Umrötung (sensorisch, in Zweifelsfällen chemisch:  $\geq 50\%$  nach Möhler-Methode)
  - Säuerung: pH-Wert  $\leq 5,6$ ; D(-)Milchsäure  $\geq 0,2$  g/100g
  - mikrobiologische Beschaffenheit (dominierende Fermentationsflora  $> 1,0 \times 10^6$  KbE/g, niedrige Keimzahlen an Gramnegativen  $< 1,0 \times 10^4$  KbE/g).

---

<sup>1</sup> Die Kriterien wurden auf der 49. Arbeitstagung vom ALTS beschlossen. Ihre Anwendung wurde im April 1997 vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) im Abschlussbericht „Bundesweite Erhebung zum mikrobiologischen Status von frischen streichfähigen Mettwürsten“ empfohlen (Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz 42. 965-966 (1999). <https://doi.org/10.1007/s001030050231>)

4. Der Zusatz von Nitrit ist dann zulässig, wenn es sich um ein nicht wärmebehandeltes Fleischerzeugnis (Kategorie 08.3.1 der VO (EU) Nr. 1333/2008) handelt. Eine Zwiebelmettwurst / frische Mettwurst gilt in jedem Fall als nicht wärmebehandeltes Fleischerzeugnis, wenn die unter 3. genannten Kriterien eingehalten sind.

*Dieser Beschluss (2022/89/29) ersetzt den Beschluss 2016/77/22.*