

**ISO 16140-6:2019**



**EN ISO 16140-6:2019**

**NBN EN ISO 16140-6:2020**



---

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette - Verfahrensvalidierung - Teil 6: Arbeitsvorschrift für die Validierung von (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung (ISO 16140-6:2019)**

---

Gültig ab 29-01-2020

ICS: 07.100.30



**CEN/TC 463**

Datum: 2019-12

**EN ISO 16140-6:2019**

CEN/TC 463

Sekretariat: AFNOR

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrenvalidierung — Teil 6:  
Arbeitsvorschrift für die Validierung von (urheberrechtlich geschützten)  
Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung  
(ISO 16140-6:2019)**

*Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes — Partie 6 : Protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) pour la confirmation microbiologique et le typage (ISO 16140-6:2019)*

*Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures (ISO 16140-6:2019)*

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokumentstufe: Annahme

Dokumentsprache: D

STD Version 2.9p

# Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort .....	4
Vorwort .....	5
Einleitung .....	6
<b>1 Anwendungsbereich.....</b>	<b>10</b>
<b>2 Normative Verweisungen .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Begriffe .....</b>	<b>11</b>
<b>4 Allgemeine Prinzipien für die Validierung von Bestätigungs- und Typisierungsverfahren ....</b>	<b>12</b>
<b>5 Stämme.....</b>	<b>13</b>
<b>6 Verfahrensvergleichsuntersuchung.....</b>	<b>13</b>
6.1 Allgemeines .....	13
6.2 Auswahl der Prüfstämme .....	13
6.3 Untersuchung zum Maß der Inklusivität.....	14
6.3.1 Prüfung der Zielstämme .....	14
6.3.2 Familien-Ebene (ohne <i>Salmonella</i> ) .....	14
6.3.3 Gattungs-Ebene (ohne <i>Salmonella</i> ).....	14
6.3.4 Spezies-Ebene (ohne <i>Salmonella</i> ).....	15
6.3.5 Ebene des mikrobiellen (Unter-)Typs (ohne <i>Salmonella</i> ).....	15
6.3.6 Gattungs- oder Spezies-Ebene von <i>Salmonella</i> .....	15
6.3.7 Serotyp-Ebene von <i>Salmonella</i> .....	15
6.4 Untersuchung zum Maß der Exklusivität .....	16
6.4.1 Prüfung von Nicht-Zielstämmen .....	16
6.4.2 Familien-Ebene (ohne <i>Salmonella</i> ) .....	16
6.4.3 Gattungs-Ebene (ohne <i>Salmonella</i> ).....	16
6.4.4 Spezies-Ebene (ohne <i>Salmonella</i> ).....	16
6.4.5 Ebene des mikrobiellen (Unter-)Typs (ohne <i>Salmonella</i> ).....	17
6.4.6 Gattungs- oder Spezies-Ebene von <i>Salmonella</i> .....	17
6.4.7 Serotyp-Ebene von <i>Salmonella</i> .....	17
6.5 Angabe und Auswertung der Ergebnisse.....	18
6.6 Auswertung.....	20
<b>7 Ringversuch.....</b>	<b>21</b>
7.1 Allgemeines .....	21
7.2 Erforderliche Datensätze.....	21
7.3 Arbeitsvorschrift .....	22
7.4 Darlegung der Ergebnisse .....	23
7.5 Auswertung und Bewertung.....	24
<b>Anhang A (normativ) Bei der Auswahl von Stämmen für die Untersuchung zur Inklusivität und Exklusivität zu berücksichtigende Aspekte.....</b>	<b>25</b>
<b>Anhang B (informativ) Beispiel für die Validierung eines alternativen Bestätigungsverfahrens auf Spezies-Ebene (<i>Listeria monocytogenes</i>).....</b>	<b>27</b>
<b>Anhang C (informativ) Beispiel für die Validierung eines alternativen Typisierungsverfahrens für die Serotyp-Ebene von <i>Salmonella</i> (soll 15 unterschiedliche Serotypen prüfen) .....</b>	<b>31</b>

<b>Anhang D (normativ) Übersicht über die verschiedenen Optionen bei der Validierung im Rahmen dieses Dokuments sowie die Zulässigkeitsgrenzen.....</b>	<b>36</b>
<b>Literaturhinweise.....</b>	<b>38</b>

**EN ISO 16140-6:2019 (D)****Europäisches Vorwort**

Dieses Dokument (EN ISO 16140-6:2019) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Juni 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 2020, zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

**Anerkennungsnotiz**

Der Text von ISO 16140-6:2019 wurde von CEN als EN ISO 16140-6:2019 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

## Vorwort

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

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

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

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

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

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology* erarbeitet.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 16140 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter [www.iso.org/members.html](http://www.iso.org/members.html) zu finden.

**EN ISO 16140-6:2019 (D)****Einleitung****0.1 Die Normenreihe ISO 16140**

Die Normenreihe ISO 16140 wurde erweitert, um auf die Anforderung zu reagieren, verschiedene Möglichkeiten zur Validierung oder Verifizierung von Prüfverfahren bereitzustellen. Sie folgt auf die Normenreihe ISO 16140:2003. Die Normenreihe ISO 16140 besteht aus sechs Teilen mit dem allgemeinen Titel *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung*:

- *Teil 1: Terminologie;*
- *Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens;*
- *Part 3: Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz- und alternativen Verfahren in einem einzelnen Labor;*
- *Teil 4: Arbeitsvorschrift für Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung;*
- *Teil 5: Arbeitsvorschrift für eine faktorielle Ringversuch-Verfahrensvalidierung für nicht urheberrechtlich geschützte Verfahren;*
- *Teil 6: Arbeitsvorschrift für die Validierung von (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung.*

ISO 17468 ist eine eng mit dieser Normenreihe verbundene Internationale Norm, die technische Regeln für die Entwicklung und Validierung von genormten Verfahren vorschreibt.

Bevor ein Verfahren im Labor eingesetzt werden kann, ist im Allgemeinen ein zweistufiger Prozess erforderlich.

- Die erste Stufe umfasst die Validierung des Verfahrens. Die Validierung erfolgt durch eine Einzel-Labor-Untersuchung gefolgt von einem Ringversuch (siehe ISO 16140-2, ISO 16140-5 und Beschreibung in diesem Dokument). Für den Fall, dass ein Verfahren innerhalb eines Einzel-Labors validiert wird (siehe ISO 16140-4), erfolgt kein Ringversuch.
- Die zweite Stufe besteht aus der Verifizierung des Verfahrens. Hier wird von einem Labor gezeigt, dass es das validierte Verfahren zufriedenstellend durchführen kann. Der Vorgang der Verfahrensverifizierung wird in ISO 16140-3 beschrieben. Die Verifizierung ist nur für Verfahren anwendbar, die durch einen Ringversuch validiert wurden.

Grundsätzlich werden zwei Arten von Verfahren unterschieden, Referenzverfahren und Alternativverfahren.

Der Begriff „Referenzverfahren“ ist in ISO 16140-1:2016, 2.59, definiert als „international anerkanntes und in hohem Maße akzeptiertes Verfahren“. In der Anmerkung zum Begriff wird erläutert, dass es sich um „ISO-Normen und Normen, welche gemeinsam durch ISO und CEN veröffentlicht wurden, oder andere regionale/nationale Normen von gleichwertigem Rang“ handelt.

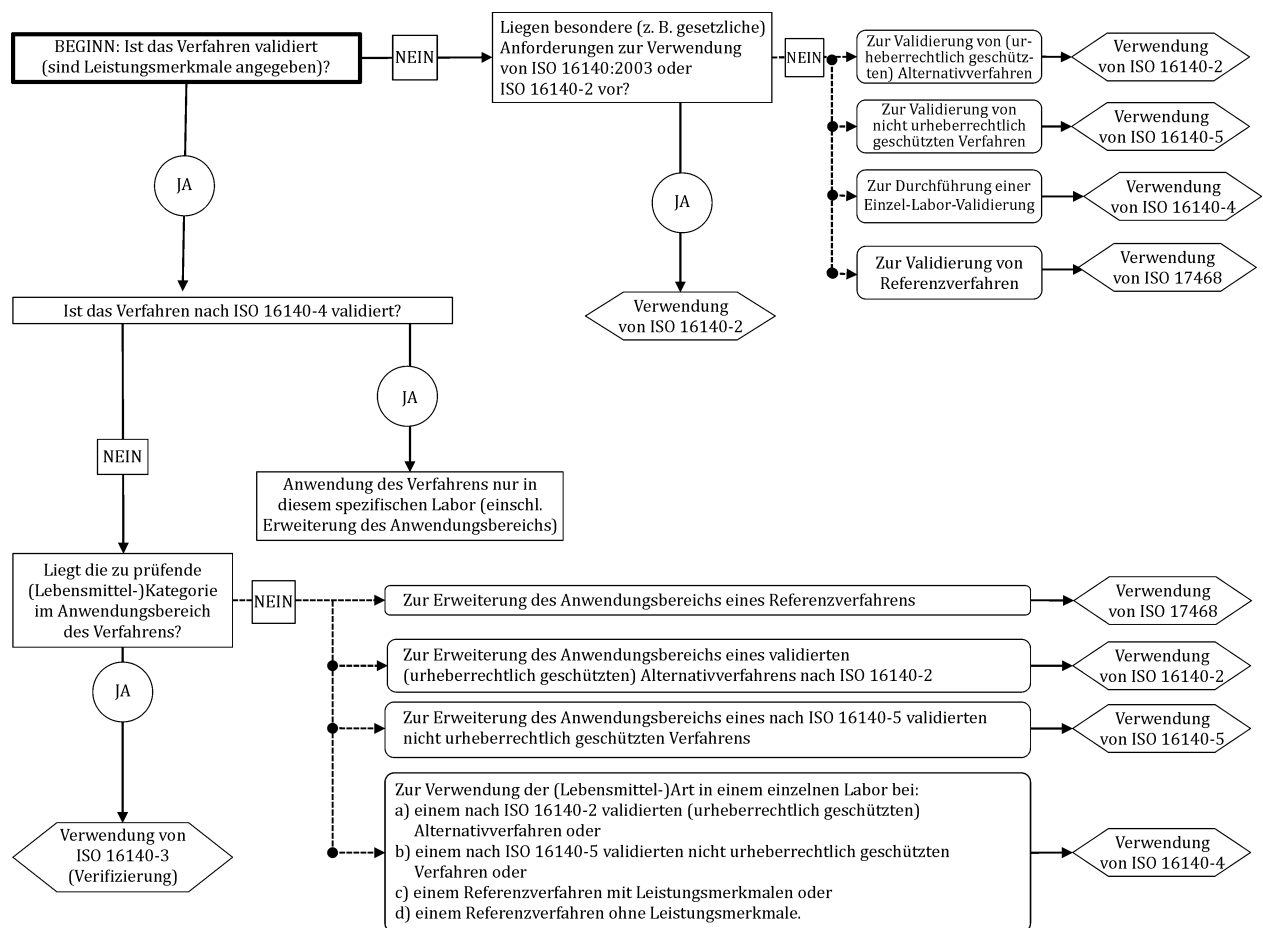
In der Normenreihe ISO 16140 umfasst der Begriff „Referenzverfahren“ auch genormte Referenz-(ISO- und CEN-)Verfahren nach der Definition in ISO 17468:2016, 3.5, wonach es sich um ein „in einer Norm beschriebenes Referenzverfahren“ handelt.



Der Begriff „alternatives Verfahren“ (Verfahren zur Validierung vorgelegt) ist in ISO 16140-1:2016, 2.4, definiert als „Untersuchungsverfahren, das bei einer bestimmten Kategorie von Produkten den gleichen Analyt nachweist oder quantitativ bestimmt, der mit dem entsprechenden Referenzverfahren bestimmt wird“. In der Anmerkung zum Begriff wird erläutert: „Das Verfahren kann urheberrechtlich geschützt sein. Die Verwendung des Begriffs „alternativ“ bezieht sich auf das gesamte „System von Prüfverfahren und Reaktion“. Der Begriff schließt alle materiellen oder sonstigen Bestandteile, die zur Durchführung des Verfahrens erforderlich sind, mit ein.“

ISO 16140-4 befasst sich mit der Validierung in einem Einzel-Labor. Die Ergebnisse gelten daher nur für das Labor, in dem die Untersuchung durchgeführt wurde. In diesem Fall ist eine Verifizierung (wie in ISO 16140-3 beschrieben) nicht anwendbar. ISO 16140-5 beschreibt Arbeitsvorschriften für nicht urheberrechtlich geschützte Verfahren, bei denen eine schnellere Validierung erforderlich ist, oder bei denen es um die Validierung hoch spezialisierter Verfahren geht und die Anzahl der nach ISO 16140-2 erforderlichen Laboratorien nicht erreicht werden kann. ISO 16140-4 (qualitativ und quantitativ) und ISO 16140-5 (nur quantitativ) können auch für die Validierung ohne Bezug auf ein Referenzverfahren verwendet werden.

Das Flussdiagramm in Bild 1 gibt einen Überblick über die Verknüpfungen zwischen den unterschiedlichen oben genannten Teilen. Darüber hinaus enthält es Anweisungen für Anwender zur Auswahl des richtigen Teils der Normenreihe ISO 16140. Dabei werden auch der Zweck der Untersuchung und die oben angegebenen Anmerkungen berücksichtigt.



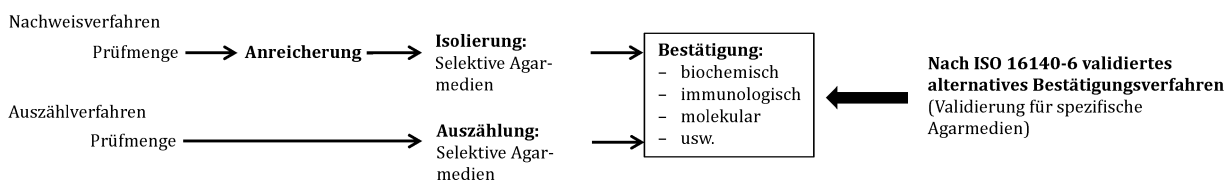
**Bild 1 — Flussdiagramm zur Anwendung der Normenreihe ISO 16140**

ANMERKUNG Zur Verbesserung der Lesbarkeit werden in diesem Dokument die Begriffe „Kategorie“, „Art“ und/oder „Einheit“ bisweilen mit dem Begriff „(Lebensmittel-)“ kombiniert. Das Wort „Lebensmittel“ kann jedoch mit „Futtermittel“ und anderen Bereichen der Lebensmittelkette ausgetauscht werden, wie in Abschnitt 1 erwähnt.

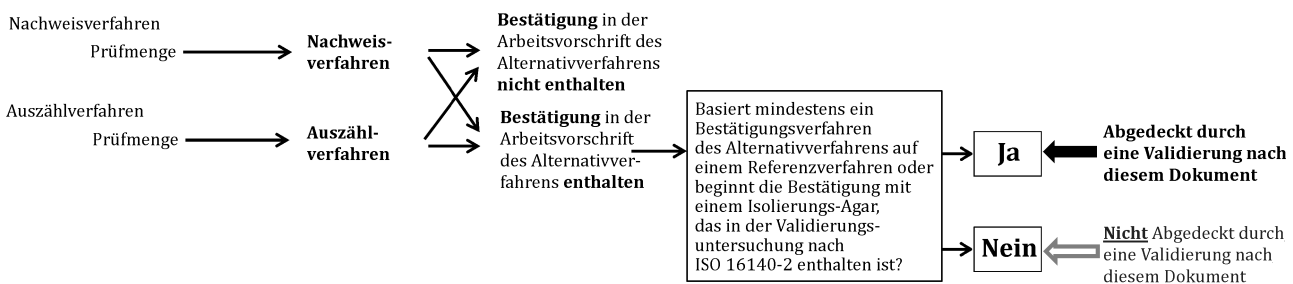
## EN ISO 16140-6:2019 (D)

Dieses Dokument, ISO 16140-6, unterscheidet sich insofern ein wenig von den anderen Teilen der Normenreihe ISO 16140, als dass es sich auf eine sehr spezifische Situation bezieht, bei der lediglich die Bestätigungsprüfung des Verfahrens zu validieren ist (z. B. die biochemische Bestätigung von *Enterobacteriaceae* (siehe ISO 21528-2)). Bei der Bestätigungsprüfung wird ein angenommenes (vermutliches) Ergebnis in ein bestätigtes positives Ergebnis umgesetzt. Die Validierung alternativer Typisierungsverfahren (z. B. bei der Serotypisierung von *Salmonella*) ist ebenfalls in diesem Dokument enthalten. Für die Validierungsuntersuchung nach diesem Dokument ist eindeutig definiert, mit welchem selektiven Agarmedium/mit welchen selektiven Agarmedien Stämme mithilfe des alternativen Bestätigungsverfahrens bestätigt werden können. Bei erfolgreicher Validierung kann das alternative Bestätigungsverfahren nur dann verwendet werden, wenn die Stämme auf einem Agarmedium wiedergefunden werden, das in der Validierungsuntersuchung verwendet und als akzeptabel dargestellt wurde. Bild 2 zeigt die Möglichkeiten, bei denen ein alternatives, nach diesem Dokument validiertes Bestätigungsverfahren verwendet werden kann (siehe Text in Kästen).

### Referenzverfahren



### Nach ISO 16140-2 validiertes Alternativverfahren



## Bild 2 — Verwendung von validierten alternativen Bestätigungsverfahren (beschrieben in diesem Dokument)

**BEISPIEL** Im Folgenden ist ein Anwendungsbeispiel für ein validiertes alternatives Bestätigungsverfahren beschrieben.

Ein auf ELISA basierendes alternatives Bestätigungsverfahren wurde als Ersatz für die biochemische Bestätigung von *Salmonella* nach ISO 6579-1 validiert. In der Validierungsuntersuchung wurden XLD-Agar (zwingend erforderliches Agarmedium nach ISO 6579-1) sowie BGA und ein spezifisches chromogenes Agarmedium (zwei optionale Agarmedien für die sekundäre Plattierung nach ISO 6579-1) als Agarmedien für den Beginn der Bestätigung verwendet. Das validierte Bestätigungsverfahren kann unter den folgenden Bedingungen als Ersatz für die biochemische Bestätigung verwendet werden:

- von Laboren, die nach ISO 6579-1 arbeiten, oder
- von Laboren, die mit einem nach ISO 16140-2 validierten, zur Bestätigung auf ISO 6579-1 verweisenden Alternativverfahren arbeiten, oder
- von Laboren, die mit einem nach ISO 16140-2 validierten Alternativverfahren arbeiten, das die Bestätigung mit XLD- und/oder BGA-Agarmedien und/oder einem spezifischen chromogenen Agarmedium beginnt.

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

- von Laboren, die mit einem nach ISO 16140-2 validierten Alternativverfahren arbeiten, das für den Beginn der Bestätigung nur auf andere Agarmedien verweist als die in der Validierung enthaltenen (z. B. nur Hektoen-Agar und SS-Agar), oder
- von Laboren, die mit einem nach ISO 16140-2 validierten Alternativverfahren arbeiten, das nur auf ein Bestätigungsverfahren verweist, das keine Isolierung auf einem Agarmedium erfordert.

## **0.2 Validierung und Verifizierung von Verfahren für mikrobiologische Bestätigungs- und Typisierungsverfahren**

Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren ist für die „vollständige“ Validierung von (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahren für die mikrobiologische Bestätigung und/oder Typisierung gedacht und wird im Folgenden als „alternatives Bestätigungsverfahren“ bezeichnet.

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

Der Vorgang der Verifizierung von alternativen Bestätigungsverfahren in Einzel-Labors wird in ISO 16140-3 beschrieben.

## EN ISO 16140-6:2019 (D)

### 1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt das allgemeine Prinzip und die technische Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Bestätigungsverfahren in der Mikrobiologie der Lebensmittelkette fest. Dieses Dokument vergleicht die Ergebnisse des alternativen Bestätigungsverfahrens mit denen des Bestätigungsvorgangs eines Referenzverfahrens oder, falls erforderlich, eines Referenzbestätigungsverfahrens (z. B. Gesamtgenomsequenzierung).

Dieses Dokument ist anwendbar auf die Validierung von alternativen Bestätigungsverfahren zur Analyse (Nachweis oder quantitative Bestimmung) von isolierten Mikroorganismen in:

- Erzeugnissen, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind;
- Erzeugnissen, die als Futtermittel vorgesehen sind;
- Umgebungsproben im Lebensmittelbereich und Handhabung in der Futtermittelproduktion;
- Proben aus dem Bereich der Primärproduktion.

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

- im Referenzverfahren,
- in einem Alternativverfahren, das nach ISO 16140-2 validiert worden ist, sofern dabei eines der in der Validierungsuntersuchung des alternativen Bestätigungsverfahrens angegebenen Isolierungs-Agars verwendet wird.

Darüber hinaus ist dieses Dokument anwendbar auf die Validierung von alternativen Typisierungsverfahren, bei denen das Referenzverfahren beispielsweise ein serologisches Verfahren (z. B. zur Serotypisierung von *Salmonella*) oder ein molekulares Verfahren sein kann (z. B. zur Typisierung von Shigatoxin bildenden *E. coli*).

Dieses Dokument gilt insbesondere für Bakterien und Pilze. Einige Abschnitte können auch auf andere (Mikro-)Organismen anwendbar sein. Die Bestimmung muss im Einzelfall erfolgen.

Validierungsuntersuchungen nach diesem Dokument sind in erster Linie dazu vorgesehen, von Organisationen oder Expertenlaboren durchgeführt werden, die an der Verfahrensvalidierung beteiligt sind. Sie können aber auch von einem Einzel-Labor verwendet werden, insbesondere bei der laborinternen Validierung unter bestimmten Bedingungen (siehe ISO 16140-4).

### 2 Normative Verweisungen

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

ISO 16140-1:2016, *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 1: Vocabulary*