



Stellungnahme des AK Futtermittelmikrobiologie der FG VI VDLUFA

Anwendbarkeit der DIN EN ISO 16140-3:2021 zur Verifizierung von Referenz- und validierten Verfahren zur Keimzählung von Mikroorganismen als Futtermittelzusatzstoff

Bevor ein quantitatives Referenz- bzw. validiertes Verfahren im akkreditierten Labor eingesetzt werden kann, ist nach DIN EN ISO 16140-3 im Allgemeinen ein zweistufiger Prozess erforderlich. Die erste Stufe umfasst die Verifizierung der Implementierung des Verfahrens durch den Vergleich der Labor-intern ermittelten Vergleichsstandardabweichung mit den Validierungskennwerten der Methode. In der zweiten Stufe ist die Anwendbarkeit des Verfahrens auf die zu untersuchenden Matrices zu zeigen. Hierzu ist die geschätzte systematische Abweichung (e_{Bias}) für mehrere Matrices zu bestimmen.

Mikroorganismen als Futtermittelzusatzstoffe (z. B. einige *Bacillus* spp, Milchsäurebakterien, Enterokokken, Clostridien oder Hefestämme) sind definierte, im Futtermittelrecht zugelassene, lebende Mikroorganismen. Diese werden Futtermitteln aufgrund ihrer probiotischen Eigenschaften oder ihrer technologischen Wirkung als Silierrhilfsmittel in bekannter (deklarerter) Menge gezielt beigemischt. Die hierfür zugelassenen Mikroorganismen werden von den Herstellerfirmen entsprechend präpariert, damit sie im Futtermittel sowie im Gastrointestinaltrakt der Tiere lebensfähig bleiben und ihre Wirkung entfalten können (z. B. durch Lyophilisation, vollständige Sporulation, Mikroverkapselung). Die verwendeten Methoden zur Quantifizierung dieser Mikroorganismen im Futtermittel müssen diese Gegebenheit berücksichtigen. Der Hersteller hat bei der Zulassung des Produktes nachzuweisen, dass das entsprechende Prüfverfahren für den jeweiligen Stamm und dessen Formulierung hinreichend gute Wiederfindungsraten garantiert. Anderenfalls muss er ein Alternativverfahren angeben, das im Rahmen der amtlichen Kontrolle einzusetzen ist. Die Methoden müssen die Quantifizierung des Mikroorganismus im reinen Zusatzstoff, in daraus hergestellten Vormischungen sowie Mischfuttermitteln in mehlförmiger, pelletierter und pastenförmiger Form einschließlich Mineralfuttermitteln und Milchaustauschern garantieren. Der AK Futtermittelmikrobiologie des VDLUFA organisiert regelmäßig Eignungsprüfungen (Ringversuche zur Qualitätssicherung und auch zur Methodenvalidierung), die die Kompetenz der Labore sowie die Anwendbarkeit der Methoden bei neu auf dem Markt befindlichen Produkten abbilden.

Der Abschnitt 6 der DIN EN ISO 16140-3 beschreibt Verifizierungsmethoden für Mikroorganismen, die natürlich in Lebensmitteln vorkommen und quantifiziert werden können. Hierbei müssen für die Bestimmung der systematischen Abweichung (e_{Bias}) Stammkulturen künstlich auf drei Beimpfungsniveaus in die Einheit dotiert werden, bei der Bestimmung der laborinternen Vergleichsstandardabweichung (S_{IR}) ist die künstliche Kontamination optional.

Die DIN EN ISO 16140-Reihe und insbesondere die technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung quantitativer Verfahren der DIN EN ISO 16140-3:2021 ist für Futtermittelzusatzstoffe aus folgenden Gründen nicht oder nur bedingt anwendbar:

Futtermittelzusatzstoffe sind teilweise patentierte zugelassene Stämme, die in ihren Eigenschaften nicht den Stammkulturen der WDCM o.ä. Sammlungen entsprechen und auch nicht



Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten

kommerziell erhältlich sind. Eine weitere Herausforderung bei derartigen Produkten ist nicht die Matrix Futtermittel an sich, sondern die „Vorabbehandlung“ der einzelnen Mikroorganismen (Verkapselung, Lyophilisation etc.). Untersuchungslabore verfügen in der Regel nicht über die genannten, teilweise patentierten Techniken der Hersteller, um ein Zusatzstoff-haltiges Futtermittel durch Selbstdotierung zu simulieren.

Im Gegensatz zu einem natürlichen Besatz mit Mikroorganismen, ist bei mikrobiellen Futtermittelzusatzstoffen von einer homogenen Verteilung der Organismen in der untersuchten Matrix auszugehen.

Die Norm DIN EN ISO 16140-3 enthält bisher keine technische Arbeitsanweisung für Proben, denen Mikroorganismen als Zusatzstoff zugesetzt wurden. Diese Problematik ist der zuständigen Arbeitsgruppe „Methodenvalidierung“ (WG3) des ISO/TC 34/SC9 bekannt. Der AK Futtermittelmikrobiologie wird der WG3 einen entsprechenden Vorschlag unterbreiten.

Nach Auffassung des AK Futtermittelmikrobiologie der FG VI des VDLUFA wird zur Verifizierung von Referenz- und validierten Verfahren zur Keimzahlbestimmung von Mikroorganismen als Futtermittelzusatzstoff folgende Verfahrensweise als sinnvoll und ausreichend angesehen:

- **Verifizierung der Implementierung (DIN EN 16140-3, 4.2, 6.1):**

Die Bestimmung einer laborinternen Vergleichsstandardabweichung (S_{IR}) gemäß Abschnitt 6.1 der EN ISO 16140-3 ist unter bestimmten Voraussetzungen möglich. Anstelle der Verwendung künstlich kontaminierter Proben, deren Herstellung aus o.g. Gründen nicht möglich ist, bieten sich auf dem Markt befindliche Futtermittel-Arten (Additiv, Vormischung, Mischfuttermittel) an, die den realen Konzentrationsbereich vollumfänglich abdecken. Hinsichtlich der Beurteilung der Zulassungsgrenze (Kap. 6.1.7 der Norm) ist zu beachten, dass Vergleichsstandardabweichungen bei Ringversuchen für mikrobielle Zusatzstoffe nicht wie in der ISO-Reihe als logarithmierte, sondern als natürliche Werte angegeben werden, da die Keimzahlen von Probiotika in Futtermitteln einer natürlichen Normalverteilung folgen. Eine Teilnahme an einer Validierungsstudie mit der Bestimmung der Vergleichsstandardabweichung wird als ausreichend angesehen. Dies stellt gemäß DIN EN ISO 19036:2020 ebenfalls eine Option zur Ermittlung der Labor-internen Vergleichsstandardabweichung dar.

- **Verifizierung der Matrix (Einheit) DIN EN ISO 16140-3, 4.3, 6.2):**

Die Anwendbarkeit des Verfahrens auf die zu untersuchenden Matrices muss der Hersteller selbst im Rahmen des Zulassungsverfahrens nachweisen. Ein Nachweis der geschätzten systematischen Abweichung (eBias) als Verifizierung der Matrix über eine Dotierung und vergleichende Untersuchung mit und ohne Matrix ist aus den o.g. genannten Gründen nicht möglich. Eine erfolgreiche Teilnahme an Ringversuchen wird hier zu diesem Zweck als ausreichend angesehen.