

DIN EN ISO 16140

ICS 07.100.30

Ersatz für
DIN EN ISO 16140:2003-09

**Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln –
Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren
(ISO 16140:2003 + Amd.1:2011);
Deutsche Fassung EN ISO 16140:2003 + A1:2011**

Microbiology of food and animal feeding stuffs –
Protocol for the validation of alternative methods (ISO 16140:2003 + Amd.1:2011);
German version EN ISO 16140:2003 + A1:2011

Microbiologie des aliments –
Protocole pour la validation des méthodes alternatives (ISO 16140:2003 + Amd.1:2011);
Version allemande EN ISO 16140:2003 + A1:2011

Gesamtumfang 93 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm enthält unverändert die Internationale Norm ISO 16140:2003, die vom ISO/TC 34 „Food products“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) in Zusammenarbeit mit den CEN /TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) erarbeitet wurde.

Diese Norm beinhaltet die bisherige EN ISO 16140:2003 und die Änderung A1:2011.

Anfang und Ende der durch die eingefügten oder geänderten Texte sind jeweils durch Änderungsmarken  angegeben.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 3534-1	siehe DIN ISO 3534-1
ISO 3534-2	siehe DIN ISO 3534-2
ISO 5725 (alle Teile)	siehe DIN ISO 5725 (alle Teile)
ISO 5725-2	siehe DIN ISO 5725-2
ISO 11095	siehe DIN ISO 11095

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 16140:2003-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Abschnitt 6.3 „Ringversuch“ wurde grundlegend überarbeitet;
- b) Anhang Q „Berechnung des Skalenschätzers Q_n nach Rousseeuw“ wurde überarbeitet;
- c) Anhänge V „Indikatoren für die robusten h - und k -Statistiken nach Mandel“ und W „Beispiel: Bestimmung von *E. coli*“ wurden neu aufgenommen;
- d) Literaturhinweise wurden ergänzt.

Frühere Ausgaben

DIN EN ISO 16140: 2003-09

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 3534-1, *Statistik — Begriffe und Formelzeichen — Teil 1: Wahrscheinlichkeit und allgemeine statistische Begriffe*

DIN ISO 3534-2, *Statistik — Begriffe und Formelzeichen — Teil 2: Angewandte Statistik*

DIN ISO 5725 (alle Teile), *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

DIN ISO 11095, *Lineare Kalibrierung unter Verwendung von Referenzmaterialien*

— Leerseite —

ICS 07.100.30

Deutsche Fassung

**Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln —
Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren
(ISO 16140:2003 + Amd.1:2011)**

Microbiology of food and animal feeding stuffs —
Protocol for the validation of alternative methods
(ISO 16140:2003 + Amd.1:2011)

Microbiologie des aliments —
Protocole pour la validation des méthodes alternatives
(ISO 16140:2003 + Amd.1:2011)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 6. Juli 2002 angenommen.

Die Änderung A1 modifiziert die Europäische Norm EN ISO 16140:2003. Sie wurde vom CEN am 29. Juli 2011 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN-CENELEC oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	5
A1 Vorwort der Änderung A1:2011	6
Einleitung	7
1 Anwendungsbereich	8
2 Normative Verweisungen	8
3 Begriffe	8
4 Allgemeine Prinzipien für die Validierung und Zertifizierung alternativer Verfahren	9
4.1 Arbeitsvorschrift für die Validierung	9
4.2 Prinzipien der Zertifizierung	10
5 Qualitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für ihre Validierung	10
5.1 Verfahrenvergleichsuntersuchung	10
5.1.1 Relative Genauigkeit, relative Spezifität und relative Empfindlichkeit	10
5.1.2 Relative Nachweisgrenze	14
5.1.3 Maß der spezifischen Erfassung (Inklusivität) und Ausschlusssicherheit (Exklusivität)	16
5.2 Ringversuch	18
5.2.1 Untersuchungsvorschrift	18
5.2.2 Berechnung	19
5.2.3 Interpretation	21
6 Quantitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für ihre Validierung	21
6.1 Allgemeines	21
6.2 Verfahrenvergleichsuntersuchung	21
6.2.1 Linearität und relative Genauigkeit	21
6.2.2 Grenzen des Nachweises und der quantitativen Bestimmung	26
6.2.3 Relative Empfindlichkeit und Bestimmung unbekannter Proben	27
6.2.4 Spezifität, Inklusivität und Exklusivität	28
6.2.5 Zusätzliche Merkmale des alternativen Verfahrens	30
A1 6.3 Ringversuch	30
6.3.1 Allgemeines	30
6.3.2 Begriffe	31
6.3.3 Arbeitsvorschrift für die Bestimmung und Proben	32
6.3.4 Bestimmung der Merkmale für die Richtigkeit und Präzision	33
6.3.5 Genaue Überprüfung der Messergebnisse auf Konsistenz	36
6.3.6 Vergleich der Merkmale für die Richtigkeit und Präzision des Referenzverfahrens und des alternativen Verfahrens A1	37
Anhang A (normativ) Spezielle Regeln für die Annehmbarkeit externer Ergebnisse, die bei einer früheren Validierungsuntersuchung gewonnen wurden	38
A.1 Allgemeines	38
A.2 Alternative Verfahren, die verändert wurden oder vorher gegenüber einer Internationalen oder Europäischen Norm validiert wurden	38
A.3 Alternative Verfahren, die nicht gegenüber einer Referenzverfahren in einer Internationalen oder Europäischen Norm validiert wurden	38
Anhang B (informativ) Einstufung von Probentypen für die Validierungsuntersuchungen	40
B.1 Lebensmittel- und Futtermittelproben	40
B.2 Veterinärmedizinische Proben	42

Anhang C (normativ) Verwendung natürlich kontaminierter Proben und Herstellung künstlich kontaminierter Proben bei Validierungsuntersuchungen.....	43
Anhang D (normativ) Doppelbestimmung von Proben für die Bestimmung der relativen Genauigkeit und der relativen Nachweisgrenze von qualitativen Verfahren	44
D.1 Fall 1: Alle Bedingungen der ersten Stufe der Anzuchtung sind bei beiden Verfahren identisch.....	44
D.2 Fall 2: Die erste Stufe der Anzuchtung beider Verfahren ist unterschiedlich.....	45
Anhang E (normativ) Berechnung der mit der Anzahl der untersuchten Proben zusammenhängenden Vertrauensintervalle	46
Anhang F (normativ) Bei der Untersuchung diskordanter Ergebnisse anzuwendende Prüfung.....	47
Anhang G (normativ) Bei der Auswahl von Stämmen für die Selektivitätsprüfung zu berücksichtigende Aspekten	48
G.1 Allgemeines	48
G.2 Kategorien von Zielgruppen.....	48
G.3 Entsprechend der in G.1 festgelegten Zielgruppe kann ein Spektrum positiver Mikroorganismen ausgewählt werden	48
G.4 Bei der Selektivitätsprüfung verwendete Nicht-Zielgruppen.....	49
Anhang H (normativ) Richtlinien für die Organisation und Durchführung von Ringversuchen	50
H.1 Vorbereitung von Lebensmittelproben	50
H.2 Transport der Proben.....	50
H.3 Organisation des Ringversuchs (siehe ENV ISO/TR 11133-1).....	51
Anhang I (normativ) Bestimmung des Nichtvorhandenseins des Zielkeims in Negativkontrollen	53
Anhang J (normativ) Mehrfachuntersuchung von Proben bei Ringversuchen für qualitative Verfahren	54
J.1 Fall 1: Die erste Stufe der Anzuchtung ist beim Referenz- und beim alternativen Verfahren identisch.....	54
J.2 Fall 2: Die Mehrfachuntersuchung erfolgt im Doppelansatz, wenn sich die ersten Kulturstufe jedes Verfahrens unterscheiden	55
Anhang K (normativ) Berücksichtigung von Daten	56
Anhang L (informativ) Ringversuch für qualitative Verfahren: Kriterien der Übereinstimmung, Konkordanz und Konkordanz odds ratio.....	57
L.1 Allgemeines	57
L.2 Übereinstimmung	58
L.2.1 Definition	58
L.2.2 Berechnung.....	58
L.3 Konkordanz.....	59
L.3.1 Begriff	59
L.3.2 Berechnung.....	59
L.4 Konkordanz odds ratio	60
L.4.1 Allgemeines und Definition	60
L.4.2 Signifikanzprüfungen.....	60
Anhang M (normativ) Mehrfachuntersuchung von Proben für die Bestimmung der relativen Genauigkeit von quantitativen Verfahren	62
M.1 Fall 1: Sowohl beim Referenz- als auch beim alternativen Verfahren wird die gleiche Dezimalverdünnung jeder Unterprobe verwendet.....	62
M.2 Fall 2: Nur für das Referenzverfahren werden Dezimalverdünnungen benötigt	63
Anhang N (normativ) Beispiele nicht annehmbarer und annehmbarer Verteilungen und Messbereiche für die Abschätzung der Regressionsgeraden bei quantitativen Verfahren.....	64
N.1 Nicht annehmbare Zustände	64
N.2 Annehmbarer Zustand	64

Anhang O (normativ) Beurteilung der Linearität bei quantitativen Verfahren durch graphische Darstellung	65
O.1 Fälle von Nichtlinearität	65
O.2 Fälle von Linearität	65
Anhang P (normativ) Nachweis- und Quantifizierungsgrenzen für Keimzahlen	66
P.1 Nachweisgrenze	66
P.2 Bestimmungsgrenze	67
P.3 Probenvolumen	67
☞ Anhang Q (normativ) Berechnung des Skalenschätzers Q_n nach Rousseeuw ☞ A1	68
Anhang R (normativ) Berechnungen mit dem Regressionsverfahren	70
R.1 Bezeichnungen und vorausgehende Schätzungen	70
R.2 Auswahl	71
R.3 Orthogonale lineare Regression (GMFR)	71
R.4 Gewöhnliche lineare Regression mit den kleinsten Quadraten (OLS)	72
R.5 Prüfung der Linearität (kein Anpassungsmangel) :	73
R.6 Vertrauensgrenzen (CL)	74
Anhang S (normativ) Berechnungsbeispiele für quantitative Verfahren	75
S.1 Fall 1 — Beispiel für die OLS-Regression (Vergleich des alternativen Verfahrens mit dem Referenzverfahren)	75
S.2 Fall 2 — Beispiel für GMFR / orthogonale Regression	77
Anhang T (normativ) Ringversuch — Doppelt bestimmte Ringversuchsergebnisse	79
Anhang U (informativ) Verzeichnis der Symbole und Abkürzungen	80
☞ Anhang V (informativ) Indikatoren für die robusten h- und k-Statistiken nach Mandel	81
Anhang W (informativ) Beispiel: Bestimmung von <i>E. coli</i> ☞ A1	82
Literaturhinweise	89

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ in Zusammenarbeit mit dem ISO/TC 34 „Agricultural food products“ erarbeitet.

Dieses Europäische Dokument muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis November 2003, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 2003 zurückgezogen werden.

Die Anhänge A, C bis K und M bis T sind normativ. Die Anhänge B, L und U sind informativ.

Dieses Dokument enthält auch Literaturhinweise.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, die Slowakei, Spanien, die Tschechische Republik, Ungarn und das Vereinigte Königreich.

A1 Vorwort der Änderung A1:2011

Der Text der Änderung von ISO 16140:2003/Amd 1:2011 wurde durch das Technische Komitee ISO/TC 34 „Food products“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ als EN ISO 16140:2003/A1:2011 erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Änderung zur Europäischen Norm EN ISO 16140:2011 muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Februar 2012, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Februar 2012 zurückgezogen werden.

Die Anhänge A, C bis K und M bis T sind normativ. Die Anhänge B, L, U, V und W sind informativ.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder] CENELEC sind 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, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 16140:2003/Amd 1:2011 wurde vom CEN als EN ISO 16140:2003/A1:2011 ohne irgendeine Abänderung genehmigt. **A1**

Einleitung

Die Notwendigkeit für die Lebensmittelindustrie, die mikrobiologische Qualität von Rohstoffen und Endprodukten und den mikrobiologischen Zustand von Herstellungsverfahren schnell zu beurteilen, hat zur Entwicklung und Verfeinerung alternativer mikrobiologischer Untersuchungsverfahren geführt, die schneller und/oder leichter durchführbar sind als die entsprechenden Referenzverfahren; einige von ihnen können auch automatisiert werden.

Einige unter diesen alternativen Verfahren können Ergebnisse erbringen, die den durch das Referenzverfahren erzielten gleichwertig sind, während andere zu merklich abweichenden Ergebnissen führen können.

Die Lieferanten/Entwickler (producers) der alternativen Verfahren, die Lebensmittel- und Getränkeindustrie, das Öffentliche Gesundheitswesen und andere Behörden benötigen eine zuverlässige allgemeine Arbeitsvorschrift für die Validierung solcher alternativer Verfahren. Die gewonnenen Daten können auch als Grundlage für die Zertifizierung eines Verfahrens durch eine unabhängige Organisation dienen.

Wegen des Aufwandes bei der Anwendung des in dieser Norm beschriebenen Verfahrens zur Vergleichsuntersuchung durch die mit der Organisation beauftragten Laboratorien ist es für die Anwendung durch einzelne Laboratorien bei deren Bewertung eines alternativen Verfahrens im Rahmen einer internen Validierung nicht immer praktikabel.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt das allgemeine Prinzip und die technische Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer Verfahren auf dem Gebiet der mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln und Futtermitteln sowie von Umwelt- und veterinärmedizinischen Proben (siehe 5.1.1.2.1) für folgende Punkte fest:

- Validierung von alternativen Verfahren, die besonders im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung angewendet werden können;
- internationale Anerkennung der durch das alternative Verfahren ermittelten Ergebnisse.

Sie enthält auch die allgemeinen Prinzipien für die Zertifizierung dieser alternativen Verfahren, die auf der in der vorliegenden Norm EN ISO 16140 festgelegten Arbeitsvorschrift für die Validierung (siehe 4.2) beruhen.

Wenn ein alternatives Verfahren als Routineuntersuchung für die hausinterne Verwendung ohne die Anforderung, die (höheren) externen Kriterien der Qualitätssicherung zu erfüllen, angewendet wird, kann eine weniger strenge vergleichende Validierung des alternativen Verfahrens zweckmäßig sein als die, die in dieser Norm festgelegt ist.

2 Normative Verweisungen

Diese Europäische Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Europäischen Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

ISO 3534-1, *Statistics — Vocabulary and symbols — Part 1: Probability and general statistical terms*

ISO 5725, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Europäischen Norm gelten die folgenden Begriffe.

3.1

alternatives Verfahren

Analyseverfahren, das bei einer bestimmten Kategorie von Produkten den gleichen Analyt (3.4) nachweist oder quantitativ schätzt, der mit dem des entsprechenden Referenzverfahren (3.2) bestimmt wird

ANMERKUNG 1 Das Verfahren kann patentiert oder nichtkommerziell sein, und es muss nicht einen gesamten Analysenablauf umfassen, das heißt von der Probenvorbereitung bis zum Untersuchungsbericht.

ANMERKUNG 2 Das alternative Verfahren weist Merkmale auf, die den Erfordernissen des Anwenders angemessen sind, zum Beispiel:

- Schnelligkeit der Analyse und/oder der Reaktion;
- Einfachheit der Durchführung und/oder der Automatisierung;
- Eigenschaften der Analyse (Präzision, Genauigkeit, Nachweisgrenze usw.);
- Miniaturisierung;
- Kostenverringerung.

ANMERKUNG 3 Die Verwendung des Begriffes „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, ein.

3.2

Referenzverfahren

international anerkanntes und in hohem Maße akzeptiertes Verfahren

ANMERKUNG Im Falle dieser Norm sind es Internationale und Europäische Normen und, falls diese nicht vorhanden, bestimmte nationale Normen von gleichwertigem Rang.

3.3

Validierung eines alternativen Verfahrens

Nachweis, dass ein ausreichender Vertrauensnachweis dafür geliefert wird, dass die durch das alternative Verfahren erzielten Ergebnisse mit den durch Anwendung des Referenzverfahrens gewonnenen vergleichbar sind

ANMERKUNG Das Wort „vergleichbar“ ist in dieser Norm EN ISO 16140 durch eine technische Arbeitsvorschrift definiert, die jedem Verfahrenstyp angepasst ist (siehe Abschnitte 5 und 6).

3.4

Analyt

durch das Analyseverfahren bestimmter Bestandteil. Es darf der Mikroorganismus selbst sein

3.5

qualitatives Verfahren

Analyseverfahren, aus dessen Reaktion sich das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein des Analyts (3.4) ergibt; der in einer bestimmten Probenmenge entweder direkt oder indirekt nachgewiesen wird

3.6

quantitatives Verfahren

Analyseverfahren, aus dessen Reaktion sich die Menge des Analyts (3.4) ergibt, der in einer bestimmten Probenmenge entweder direkt (zahlenmäßig bestimmt als Masse oder Volumen) oder indirekt (Farbabsorption, Impedanz usw.) gemessen wird

3.7

Verfahrensvergleichsuntersuchung

durch das mit der Organisation beauftragte Laboratorium durchgeführte Untersuchung des alternativen Verfahrens gegenüber dem Referenzverfahren

3.8

Ringversuch

Untersuchung der Leistung der Verfahren unter Verwendung üblicher Proben in mehreren Laboratorien unter der Leitung des mit der Organisation beauftragten Laboratoriums

3.9

mit der Organisation beauftragtes Laboratorium

Laboratorium, das über das qualifizierte Personal und die Fachkenntnisse verfügt, die Verfahrensvergleichsuntersuchung durchzuführen und den Ringversuch zu organisieren

ANMERKUNG Für die Analyse der Ergebnisse ist das Vorhandensein eines erfahrenen Statistikers von wesentlicher Bedeutung.

4 Allgemeine Prinzipien für die Validierung und Zertifizierung alternativer Verfahren

4.1 Arbeitsvorschrift für die Validierung

Die Arbeitsvorschrift für die Validierung umfasst zwei Phasen:

- eine Verfahrensvergleichsuntersuchung (3.7) des alternativen Verfahrens (3.1) gegenüber dem Referenzverfahren (3.2), durchgeführt im mit der Organisation beauftragten Laboratorium;
- einen Ringversuch (3.8) mit jedem der beiden Verfahren.

In geeigneten Fällen dürfen beide Phasen parallel durchgeführt werden.

Die technischen Regeln für die Durchführung der Verfahrensvergleichsuntersuchung und des Ringversuchs sind in den Abschnitten 5 und 6 angegeben, je nachdem, ob es sich beim alternativen Verfahren um ein qualitatives oder quantitatives handelt.

Falls das alternative Verfahren bereits validiert worden ist und die durch eine andere Organisation festgelegten Anforderungen erfüllt, sind in Anhang A spezielle Regeln für die Annahme der Ergebnisse dieser früheren Validierung festgelegt.

4.2 Prinzipien der Zertifizierung

4.2.1 Falls in der Folge eine Zertifizierung des alternativen Verfahrens erforderlich ist, sind auch die beiden folgenden Prinzipien anzuwenden (zusätzlich zu 4.1):

Einzelheiten zur Organisation der Zertifizierung (Management der Verfahrensvergleichsuntersuchung und des Ringversuchs, die Gesamtheit der verschiedenen Institutionen, einschließlich des Expertenlaboratoriums – in dieser Norm als mit der Organisation beauftragtes Laboratorium bezeichnet –, der Rezensenten, Zertifizierungsstelle usw.) werden von der Zertifizierungsstelle vorgeschrieben [8].

4.2.2 Der Hersteller (manufacturer) muss ein **Qualitätssicherungssystem** anwenden, das die Verfahrenslinie für das Produkt umfasst, für das die Zertifizierung angestrebt wird; auf der Grundlage der entsprechenden Europäischen Norm, die für Qualitätssicherungssysteme gilt, oder einer anderen gleichwertigen Internationalen Norm (zum Beispiel EN ISO 9001).

Bei der Vergabe der Zertifizierung muss die Zertifizierungsorganisation das Vorhandensein jedes Zertifikats für das Qualitätssicherungssystem berücksichtigen, das durch eine für Qualitätssicherungssysteme akkreditierte Zertifizierungsstelle erteilt wurde.

4.2.3 Nach der Zertifizierung ist eine **regelmäßige Verifizierung** der Qualität des zertifizierten Verfahrens durchzuführen. Es ist ein regelmäßiges Audit durchzuführen, um nachzuweisen, dass folgende Anforderungen noch erfüllt sind:

- die Anforderungen der Qualitätssicherung (siehe 4.2.1);
- die Anforderungen an die Kontrolle der Herstellung des Produkts (siehe 4.2.1).

Zusätzlich zu den allgemeinen Anforderungen, die sich aus der entsprechenden Europäischen Norm in Bezug auf das Qualitätssicherungssystem ergeben, legt der Hersteller (manufacturer) der Zertifizierungsorganisation regelmäßig eine aktualisierte Dokumentation vor, in der Veränderungen am Produkt oder am Herstellungsprozess berücksichtigt werden, die sich auf die Anweisungen für die Anwendung des Verfahrens und/oder auf die Leistung des Verfahrens auswirken könnten. Die Zertifizierungsorganisation entscheidet dann, ob die Veränderungen sich auf die Zertifizierung auswirken.

5 Qualitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für ihre Validierung

5.1 Verfahrensvergleichsuntersuchung

5.1.1 Relative Genauigkeit, relative Spezifität und relative Empfindlichkeit

5.1.1.1 Begriffe

Für die Anwendung dieser Norm gelten die folgenden Begriffe:

5.1.1.1.1 Relative Genauigkeit (accuracy, *AC*)

der Grad der Übereinstimmung zwischen dem durch das Referenzverfahren erzielten und dem durch das alternative Verfahren erzielten Ergebnis bei identischen Proben¹⁾ (siehe 5.1.1.3.1).

ANMERKUNG Der Begriff „relative Genauigkeit“ ist hier eine Ergänzung zu „Genauigkeit“ und „Richtigkeit“, wie sie in ISO 5725-1 und ISO 3534-1 definiert sind. Dort ist festgelegt, dass die Genauigkeit „das Ausmaß der Annäherung zwischen einem Ermittlungsergebnis und dem anerkannten Bezugswert“ und die Richtigkeit „das Ausmaß der Annäherung zwischen dem Mittelwert aus einer großen Serie von Ermittlungsergebnissen und einem anerkannten Bezugswert“ ist. Für die Anwendung dieser Norm wird als anerkannter Bezugswert der Wert angesehen, der durch das Referenzverfahren erhalten wurde. So impliziert der Begriff „relativ“, dass durch das Referenzverfahren nicht automatisch der anerkannte Bezugswert ermittelt wird.

5.1.1.1.2 Positivabweichung (positive deviation, *PD*)

Wenn das alternative Verfahren ein Positivergebnis ergibt, während das Referenzverfahren ein Negativergebnis ergibt, und es dabei eine Positivabweichung zeigt, wird es falsch positiv.

Eine Positivabweichung wird ein falsch positives Ergebnis, wenn das wahre Ergebnis als negativ bewiesen werden kann.

Eine Positivabweichung wird als richtig positiv angesehen, wenn das wahre Ergebnis als positiv bewiesen werden kann.

5.1.1.1.3 Negativabweichung (negative deviation, *ND*)

Das alternative Verfahren zeigt eine Negativabweichung, wenn es ein Negativergebnis erbringt, während das Referenzverfahren ein Positivergebnis erbringt.

Eine Negativabweichung wird ein falsch negatives Ergebnis, wenn das wahre Ergebnis als positiv bewiesen werden kann.

5.1.1.1.4 Relative Empfindlichkeit (sensitivity, *SE*)

Eignung des alternativen Verfahrens, den Analyt nachzuweisen, wenn er mit dem Referenzverfahren nachgewiesen wird (siehe 5.1.1.3.1).

5.1.1.1.5 Relative Spezifität (*SP*)

Eignung des alternativen Verfahrens, den Analyt nicht nachzuweisen, wenn er mit dem Referenzverfahren nicht nachgewiesen wird (siehe 5.1.1.3.1).

5.1.1.2 Verfahrensvorschrift für die Bestimmung

5.1.1.2.1 Lebensmittelproben

Es ist von höchster Wichtigkeit, für die Validierung Lebensmittelproben zu finden, die natürlich mit dem nachzuweisenden Analyt kontaminiert sind.

Falls die Validierung des Verfahrens für alle Lebensmittel angestrebt wird, sind fünf Lebensmittelkategorien zu untersuchen. Diese Anzahl darf auf 1, 2, 3 oder 4 Kategorien verringert werden, wenn die Validierung des alternativen Verfahrens auf Anforderung des Entwicklers (producer) auf diese festgelegten Kategorien beschränkt werden soll. Die empfohlenen Kategorien sind in Anhang B aufgeführt.

Geeignete Umweltproben dürfen als eine Kategorie einbezogen werden. Veterinärmedizinische Proben dürfen als eine andere Kategorie geführt werden. (siehe Anhang B)

¹⁾ Dies ist schwierig zu erreichen, wenn die Voranreicherungsschritte unterschiedlich sind.

Es ist wünschenswert, dass Lebensmittelproben aus einem möglichst großen Verbreitungsgebiet kommen, um eine mögliche systematische Abweichung (bias) aufgrund örtlich vorkommender Lebensmittelspezialitäten zu verringern und den Bereich der Validierung zu erweitern.

Bei der Untersuchung natürlich kontaminierter Proben sollten der Bereich und die Verteilung der Kontamination der Proben für die üblicherweise in jenem Produkt gefundenen Konzentrationen repräsentativ sein, jedoch mit Betonung geringerer Keimzahlen.

Falls es nicht möglich ist, für jede der Kategorien eine ausreichende Anzahl natürlich kontaminierter Lebensmittel zu beschaffen, ist die künstliche Kontamination von Lebensmittelproben erlaubt. Verfahren und Konzentrationen der Kontamination sollten zu Proben führen, die ein ähnliches Verhalten wie die natürlich kontaminierten aufweisen. Zu Beimpfungsverfahren und zu Einschränkungen siehe Anhang C.

5.1.1.2.2 Anzahl der Proben

Die Gesamtanzahl der Einwaagen beträgt 60 für jede Lebensmittelkategorie, die aus den in Anhang B aufgeführten Kategorien ausgewählt wurde. Innerhalb jeder Kategorie werden repräsentative Lebensmitteltypen ausgewählt und von jedem werden 20 der Untersuchungsteilproben mit dem vorgeschlagenen Verfahren und dem Referenzverfahren untersucht, um mindestens 60 Gesamtergebnisse für jede Kategorie mit jedem Verfahren zu erzielen. Für natürlich kontaminierte Lebensmitteltypen werden die Proben wie in Anhang D beschrieben vorbereitet. Bei künstlich kontaminierten Lebensmitteltypen werden die Beimpungskonzentrationen so eingestellt, dass eine positive teilweise Wiederfindung der mit mindestens einem der Verfahren untersuchten Untersuchungsteilproben erreicht wird. Eine teilweise Wiederfindung ist erreicht, wenn einige, jedoch nicht alle, Untersuchungsteilproben mit einem oder beiden Verfahren, dem alternativen oder Referenzverfahren, als positiv bestimmt werden.

Es ist wünschenswert, dass von den erzielten Ergebnissen ungefähr 50 % positiv und 50 % negativ sind. Das ist jedoch eine Empfehlung und kein absoluter prozentualer Anteil, vorausgesetzt, dass einige der Untersuchungsteilproben des selben Lebensmitteltyps positiv und einige negativ sind.

5.1.1.2.3 Herstellung der Untersuchungsprobe

So weit dies möglich ist, müssen das Referenzverfahren und das alternative Verfahren mit genau der gleichen Probe durchgeführt werden.

Wenn die erste Stufe jedes Verfahrens die gleiche ist (zum Beispiel Verwendung der gleichen Voranreicherungsbouillon), wird die Doppeluntersuchung vom zweiten Untersuchungsschritt an durchgeführt (Fall 1, Anhang D).

Wenn dies nicht der Fall ist, das heißt, wenn das erste Nährmedium, Verfahren oder die erste Verdünnungsstufe unterschiedlich ist, werden paarweise Einwaagen für die Untersuchung hergestellt. Im Folgenden werden zwei grundlegende Verfahren für derartige Herstellungen aufgeführt.

Im ersten Verfahren wird die doppelte Probenmasse mit der gleichen Masse bzw. dem gleichen Volumen sterilen Wassers oder eines sonstigen geeigneten Verdünnungsmittels gemischt und sehr gründlich homogenisiert. Dann wird das Gemisch in zwei Anteile geteilt, wobei besonders darauf zu achten ist, dass die Konzentration des Hauptanreicherungsmediums ungefähr 10 % beträgt, um den Verdünnungseffekt des Homogenisierungsschrittes auszugleichen (Fall 2, Anhang D).

Im zweiten Verfahren wird der Lebensmitteltyp direkt mit einem Anfangsinoculum beimpft, das eine teilweise Wiederfindung der Mikroorganismen in der Einwaage mit mindestens einem der Verfahren erlaubt, nachdem sich die Mikroorganismen im Lebensmitteltyp equilibriert haben. Dann werden Einwaagen von 25 g eingewogen und es wird wie in Anhang D beschrieben verfahren. Das könnte für flüssige Produkte bevorzugt werden, aber es ist für jeden Lebensmitteltyp annehmbar, vorausgesetzt, dass das Lebensmittel gründlich homogenisiert ist.

5.1.1.3 Berechnung und Interpretation

5.1.1.3.1 Bearbeitung von Daten

Die Daten der Untersuchungspaare aus dem Referenzverfahren und dem alternativen Verfahren werden in einer Tabelle erfasst und folgende Parameter werden nach Tabelle 1 für jede Lebensmittelkategorie (60 Proben) berechnet.

Tabelle 1 — Untersuchungspaare aus dem Referenzverfahren und dem alternativen Verfahren

Ergebnisse	Referenzverfahren positiv (R+)	Referenzverfahren negativ (R-)
Alternatives Verfahren, positiv (A+)	+/+ positive Übereinstimmung (<i>PA</i>)	-/+ Positivabweichung (<i>PD</i>) (R-/A+)
Alternatives Verfahren, negativ (A-)	+/- Negativabweichung (<i>ND</i>) (A-/R+)	-/- negative Übereinstimmung (<i>NA</i>)

Die Berechnungen müssen mit einer Anzahl von mit dem Referenzverfahren erhaltenen negativen Ergebnissen durchgeführt werden, die für die Ergebnisse in Tabelle 1 das Doppelte der Anzahl der positiven Ergebnisse nicht übersteigen können; die negativen Ergebnisse werden, in der Reihenfolge der Untersuchung der Proben, als unmittelbar einem positiven Ergebnis folgend ausgewählt.

Die drei Kriterien werden wie folgt ausgedrückt:

— **Relative Genauigkeit:** $AC = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\%$;

— **Relative Spezifität:** $SP = \frac{NA}{N_-} \times 100\%$;

— **Relative Empfindlichkeit:** $SE = \frac{PA}{N_+} \times 100\%$

Dabei ist

N die Gesamtanzahl der Proben ($NA + PA + PD + ND$);

N_- die Gesamtanzahl negativer Ergebnisse mit dem Referenzverfahren ($NA + PD$);

N_+ die Gesamtanzahl positiver Ergebnisse mit dem Referenzverfahren ($PA + ND$).

5.1.1.3.2 Vertrauensintervalle

Die Berechnung der mit der Anzahl der untersuchten Proben zusammenhängenden Vertrauensintervalle ist in Anhang E angegeben.

5.1.1.3.3 Diskordante Ergebnisse

Die diskordanten Ergebnisse werden wie in Anhang F (McNemar-Test) beschrieben untersucht, wobei die Anzahlen von *PD* und *ND* eingesetzt werden (siehe 5.1.1.3.1).

Falls die Werte für *PD* und *ND* hoch und fast gleich sind, kann mit dem McNemar-Test im statistischen Sinne kein Unterschied zwischen den Verfahren festgestellt werden. In diesem Fall muss das mit der Organisation beauftragte Laboratorium der Erläuterung der Gründe für die hohen Werte von *PD* und *ND* weitere Beachtung schenken. Zudem zeigt dies, dass die relative Genauigkeit eines Verfahrens niemals nur unter Berücksichtigung des McNemar-Tests interpretiert werden darf.

5.1.1.3.4 Zusammenfassung der Berechnung

Alle Berechnungen werden nach Tabelle 2 zusammengefasst:

Tabelle 2 — Berechnung der relativen Genauigkeit, der relativen Empfindlichkeit und der relativen Spezifität

Matrizes	PA	NA	ND	PD	Summe	Relative Genauigkeit AC (%)	N_+	Relative Empfindlichkeit SE (%)	N_-	Relative Spezifität SP (%)
					N	$\frac{100 \times (PA + NA)}{N}$	$PA + ND$	$\frac{100 \times PA}{N_+}$	$NA + PD$	$\frac{100 \times NA}{N_-}$
Lebensmittel-Kategorie 1										
Lebensmittel-Kategorie 2										
Lebensmittel-Kategorie 3										
Lebensmittel-Kategorie 4										
Lebensmittel-Kategorie 5										
GESAMT										

5.1.1.3.5 Interpretation

Es ist eine Tabelle mit den Rohergebnissen (das sind **alle** positiven und negativen Ergebnisse, Tabelle 1) zu erstellen.

Unter Berücksichtigung der Anzahl der Positivabweichungen und der Negativabweichungen wird die Eignung des alternativen Verfahrens, mehr oder weniger richtig positive Ergebnisse zu erbringen als das Referenzverfahren, bewertet.

Im Untersuchungsbericht muss zwischen den Ergebnissen unterschieden werden, die mit natürlich kontaminierten und mit künstlich kontaminierten Proben gewonnen wurden.

Im Untersuchungsbericht muss das Verfahren der künstlichen Kontaminierung von Untersuchungsproben beschrieben werden.

Für die Bewertung der relativen Genauigkeit dürfen andernorts veröffentlichte und die in Anhang A festgelegten Bedingungen erfüllende Daten verwendet werden.

5.1.2 Relative Nachweisgrenze

5.1.2.1 Definition

Für die Anwendung dieser Norm ist die relative Nachweisgrenze die kleinste Anzahl anzüchtbarer Mikroorganismen (3.4), die mit einer 50%igen Treffsicherheit durch das alternative und das Referenzverfahren in der Probe nachgewiesen werden kann.

5.1.2.2 Untersuchungsvorschrift

Untersucht wird Folgendes:

- ein Lebensmittel aus jeder nach 5.1.1.2.1 gewählten Lebensmittelkategorie, je nach dem Anwendungsbereich der Validierung (siehe Anhang B);
- verwendet werden fünf unterschiedliche Zielkeime (oder weniger, in Abhängigkeit von dem Anwendungsbereich der Validierung), wenn möglich, jeder davon zu einer Lebensmittelkategorie zugehörig. (Siehe G.1 zur Festlegung des Zielkeims);
- verwendet werden vorzugsweise fünf Konzentrationen (aber mindestens drei Konzentrationen) eines Zielkeims je Lebensmittel, einschließlich die Negativkontrolle, usw. Die erste Konzentration muss die Negativkontrolle sein. Die zweite Konzentration muss die theoretische Nachweisgrenze sein. Die dritte Konzentration muss gerade oberhalb der theoretischen Nachweisgrenze liegen und jede folgende Konzentration muss höher sein als die vorangegangene. Zwischen jeder der höheren Konzentrationen könnte ein Faktor von etwa 3 angewandt werden;
- bei jeder Kombination (Lebensmittel, Konzentration der Kontamination) werden sowohl nach dem alternativen als auch nach dem Referenzverfahren sechs Mehrfachuntersuchungen durchgeführt. Die Teilung beginnt ab dem Schritt, ab dem sich die Verfahren unterscheiden, wie in Anhang D dargestellt. So wird, wenn der erste Schritt jedes Verfahrens der gleiche ist (z. B. Verwendung der gleichen Voranreicherungsbouillon), die Mehrfachuntersuchung mit dem zweiten Schritt begonnen (Fall 1, Anhang D). Wenn dies nicht der Fall ist, d. h. wenn das erste Nährmedium, Verfahren oder die erste Verdünnungsstufe unterschiedlich ist, wird eine doppelte Probenmasse mit der gleichen Masse bzw. dem gleichen Volumen sterilen Wassers oder eines sonstigen geeigneten Verdünnungsmittels gemischt und in zwei Teile aufgeteilt;
- das alternative und das Referenzverfahren werden vollständig einschließlich der Probenvorbereitung durchgeführt. Die Lebensmittelprobe darf vor ihrer Eingabe in das Nährmedium oder danach beimpft werden.

Falls erforderlich, wird die Menge der Lebensmittelprobe oder die Anzahl an Mehrfachproben vergrößert, um eine bessere Präzision bei der niedrigsten Beimpfungskonzentration zu erreichen. Zum Beispiel werden 75 g Lebensmittelprobe mit drei Zellen beimpft anstatt 25 g mit einer Zelle.

Je größer die Anzahl der unterschiedlichen Beimpfungskonzentrationen ist, umso präziser wird die Nachweisgrenze bestimmt.

5.1.2.3 Berechnung

Für jede Konzentration L_i ($i = 0$ bis 3) und jedes Lebensmittel/jeden Stamm ($j = 1$ bis 5) werden beide Verfahren verglichen, wie in Tabelle 3 angegeben:

Tabelle 3 — Berechnung der relativen Nachweisgrenze

		Ergebnisse		
		negativ (–)	positiv (+)	gesamt
Verfahren	Referenz	a	$n - a$	$n = 6$
	alternativ	b	$n - b$	$n = 6$
	gesamt	$a + b$	$2n - (a + b)$	$2n = 12$

Bei kleinen 2×2 -Tafeln werden genaue Fisher-Tests durchgeführt [8].

Vergleiche

Anstatt nur beide Verfahren bei jeder Konzentration und jedem Lebensmittel/Stamm zu vergleichen, kann derselbe Test für den Vergleich von zwei Lebensmitteln/Stämmen bei der gleichen Konzentration angewendet werden.

Wenn Lebensmittel/Stämme vergleichbar erscheinen, steht derselbe Test bei $n > 6$ für gepoolte Lebensmittel/Stämme bei jeder Konzentration L_i zur Verfügung.

Auch die Konzentrationen können zu Durchführung von Überprüfungen gepoolt werden, hierbei ist jedoch folgende Rangordnung anzuwenden: $L_0 + L_1$, $L_0 + L_1 + L_2$, $L_1 + L_2$, $L_0 + L_1 + L_2 + L_3$, $L_1 + L_2 + L_3$, $L_2 + L_3$...; dabei können die Lebensmittel/Stämme gepoolt werden oder nicht.

Alle signifikanten Unterschiede zwischen Verfahren, Lebensmitteln/Stämmen und/oder Konzentrationen sind im Bericht zu erfassen.

5.1.2.4 Interpretation

Die Interpretation muss durch das mit der Organisation beauftragte Laboratorium erfolgen, dessen Aufgabe die Vergleichsuntersuchung ist.

Die relative Nachweisgrenze liegt zwischen den beiden Konzentrationen der Kontamination, die weniger beziehungsweise mehr als in 50 % der Fälle die Nachweisgrenze ergeben. Die relative Nachweisgrenze wird folglich als Bereich ausgedrückt.

5.1.3 Maß der spezifischen Erfassung (Inklusivität) und Ausschlusssicherheit (Exklusivität)

5.1.3.1 Definition

Inklusivität ist die Eignung eines alternativen Verfahrens, den Zielanalyten in einem breiten Spektrum von Stämmen nachzuweisen.

Exklusivität ist das Nichtvorhandensein störender Einflüsse eines relevanten Spektrums von Nicht-Zielstämmen beim alternativen Verfahren.

5.1.3.2 Verfahrensvorschrift

5.1.3.2.1 Auswahl von Prüfstämmen

5.1.3.2.1.1 Allgemeines

Für Mikroorganismen wird ein Spektrum von Stämmen ausgewählt, um eine etwa vorhandene lokale systematische Abweichung (bias) zu vermeiden.

Die Kriterien für die Auswahl von Prüfstämmen sind in Anhang G angegeben.

Jeder Stamm muss ausreichend detailliert biochemisch, serologisch und, falls dies von Bedeutung ist, genetisch charakterisiert sein, damit seine Identität feststellbar ist und er sollte vorzugsweise aus dem Lebensmittel isoliert werden. Ebenso müssen die Lebensmittel, aus denen er ursprünglich isoliert worden ist, bekannt und dokumentiert sein.

5.1.3.2.1.2 Zielkeime

Es werden mindestens 50 Reinkulturen von Mikroorganismen ausgewählt, die für das alternative Verfahren und das zur Untersuchung verwendete Lebensmittel von Bedeutung sind (siehe G.3), mit Ausnahme von *Salmonella*.

Für spezielle Verfahren für *Salmonella* werden mindestens 30 Reinkulturen von Mikroorganismen ausgewählt.

5.1.3.2.1.3 Nicht-Zielkeime

Es werden mindestens 30 Reinkulturen von Mikroorganismen ausgewählt, sowohl von Stämmen, von denen bekannt ist, dass sie störende Einflüsse (Interferenzen) gegenüber dem Zielkeim ausüben, als auch von Stämmen, die in jedem Lebensmittelprüfmateriale, das in die Validierung einbezogen wird, natürlich vorkommen (siehe G.4).

5.1.3.2.2 Beimpfung

5.1.3.2.2.1 Allgemeines

Jede Untersuchung wird einmal durchgeführt. Das Wachstumsmedium wird mit einer Verdünnung einer Reinkultur jedes Prüfstamms beimpft. Es wird keine Lebensmittelprobe zugesetzt.

5.1.3.2.2.2 Zielkeime

Die Beimpfungskonzentration muss 10-mal bis 100-mal größer sein als die geringste relative Nachweiskonzentration des alternativen Verfahrens bei Anwendung der vollständigen Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens, einschließlich einer Voranreicherung, sofern diese vorgeschrieben ist. Wenn falsch negative oder zweifelhafte Ergebnisse erhalten werden, muss der Prüfkeim einmal mehr zusammen mit dem Referenzverfahren untersucht werden.

5.1.3.2.2.3 Nicht-Zielkeime

Die Beimpfungskonzentration eines Stammes muss der höchsten kontaminierenden Konzentration ähnlich sein, deren Vorhandensein in allen verwendeten Lebensmittelkategorien erwartet wird.

Die Exklusivität muss festgestellt werden. Falls das endgültige Nährmedium des Kulturmediums eine selektive Bouillon ist, würde es durch eine geeignete nicht-selektive Bouillon ersetzt werden. Falls das alternative Verfahren bei Nicht-Zielkeimen positive oder zweifelhafte Ergebnisse erbringt, ist die Untersuchung unter Durchführung der vollständigen Arbeitsvorschrift zu wiederholen. Die Untersuchung mit dem Referenzverfahren wird nur einmal durchgeführt.

5.1.3.3 Angabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden nach Tabelle 4 erfasst:

Tabelle 4 — Darstellung der Ergebnisse für die Selektivität

Mikroorganismen	Ergebnisse			
	Referenzverfahren		Alternatives Verfahren	
	Erwartetes Ergebnis	Tatsächliches Ergebnis	Erwartetes Ergebnis	Tatsächliches Ergebnis
Zielstämme				
1				
2				
usw.				
Nicht-Zielstämme				
1				
2				
usw.				

5.1.3.4 Interpretation

Die Interpretation muss durch das mit der Verfahrensvergleichsuntersuchung beauftragte Laboratorium erfolgen, da sowohl quantitative als auch qualitative Aspekte (das sind Pathogenität, Anzahl des Vorkommens (Prävalenz), Merkmale der Kulturen von Prüfstämmen, zum Beispiel Beweglichkeit, Sensibilität gegenüber schädigenden Substanzen usw.) berücksichtigt werden müssen.

Durch das mit der Verfahrensvergleichsuntersuchung beauftragte Laboratorium dürfen auch andere veröffentlichte Daten, die die Anforderungen dieser EN ISO 16140 erfüllen, verwendet werden, um zu den oben genannten Kriterien weitere Informationen zu liefern. (Siehe Anhang A, in dem Kriterien für die Annehmbarkeit externer Ergebnisse angegeben sind.)

5.2 Ringversuch

ANMERKUNG Das Ziel des Ringversuches ist die Bestimmung der Schwankungen der in unterschiedlichen Laboratorien bei Verwendung identischer Proben erhaltenen Ergebnisse und der Vergleich dieser Ergebnisse mit denen aus der Verfahrensvergleichsuntersuchung.

5.2.1 Untersuchungsvorschrift

5.2.1.1 Der Ringversuch muss mindestens zehn teilnehmende Laboratorien mit Ergebnissen ohne Ausreißer umfassen.

Anleitungen und Anforderungen für Organisation, Leitung und Durchführung der Ringversuche sind in Anhang H angegeben.

Der Analytiker in jedem teilnehmenden Laboratorium muss seine Sachkenntnis für die Anwendung des alternativen Verfahrens und des Referenzverfahrens vor der ordnungsgemäßen Teilnahme an der Studie nachweisen.

5.2.1.2 Es gilt folgende Arbeitsvorschrift:

- zur Herstellung der Untersuchungsproben wird eine relevante Lebensmittelmatrix (Anhang B) verwendet;
- die Arbeitsvorschrift für die künstliche Kontamination der Lebensmittelprobe muss für das ausgewählte Lebensmittelsubstrat geeignet sein. Jede Lebensmittelprobe muss einzeln beimpft werden. Zu jeder Probe wird eine Blindbestimmung vorbereitet, um die Homogenität zwischen den Proben nach der individuellen Beimpfung einer jeden sicherzustellen. Eine geeignete Anzahl an Proben muss für die Bestimmung der Homogenität untersucht werden (siehe Anhang H);
- es sind mindestens drei verschiedene Konzentrationen der Kontamination anzuwenden: eine Negativkontrolle (L_0), eine Konzentration gering oberhalb der Nachweisgrenze des alternativen Verfahrens (L_1) und eine, die etwa 10-mal höher als die Nachweisgrenze ist (L_2) (zum Beispiel 0, 3 und 30 Zellen je 25 g);
- für jede Konzentration der Kontamination werden mindestens 8 Blindbestimmungen durch jedes teilnehmende Laboratorium sowohl mit dem Referenz- als auch dem alternativen Verfahren untersucht;
- für die Untersuchung wird eine Suspension aus jeder vollständigen Probe hergestellt;
- die Probenuntersuchung ist in jedem Laboratorium zum festgelegten Datum durchzuführen;
- die Untersuchungsproben werden nach Anhang J angezüchtet. Wenn also der erste Anzüchtungsschritt beim Referenz- und alternativen Verfahren der gleiche ist, wird diese Kultur zur Beimpfung bei jedem der folgenden Schritte verwendet (Fall 1, Anhang J). Wenn sich die Primärkulturen jedes Verfahrens unterscheiden, erfolgen die Mehrfachuntersuchungen durch individuelle Anwendung jedes Verfahrens (Fall 2, Anhang J);
- in beiden Fällen ist die Kombination „Anzahl der Konzentrationen der Kontamination/Anzahl der Mehrfachuntersuchungen/Anzahl der Laboratorien ohne Ausreißer“ so zu wählen, dass mindestens **480 Ergebnisse (240 für jedes Verfahren)** für die Verwendung bei der Berechnung erhalten werden.

5.2.1.3 Das mit der Organisation beauftragte Laboratorium, das alle dokumentierten Daten verarbeitet, (siehe H.3), muss festlegen, welche Ergebnisse geeignet sind und welche bei der Verwendung für die Präzisionsdaten Ausreißer sind. Siehe die Richtlinien in Anhang K zur Definition mikrobiologischer Bedingungen für die Verwerfung von Daten.

WARNUNG — Ausreißer: Ergebnisse von beteiligten Laboratorien dürfen nicht ausgeschlossen werden, wenn für deren Begründung keine eindeutige Erklärung oder kein grober Fehler vorliegt.

5.2.2 Berechnung

5.2.2.1 Für jede Konzentration werden die mit beiden Verfahren erhaltenen Positivergebnisse entsprechend Tabellen 5 und 6 eingetragen:

Tabelle 5 — Positivergebnisse mit dem Referenzverfahren

Laboratorien	Konzentration der Kontamination		
	L_0	L_1	L_2
Laboratorium 1	/8	/8	/8
Laboratorium 2	/8	/8	/8
Laboratorium 3	/8	/8	/8
usw.	/8	/8	/8
Gesamt	FP^a	TP_1^b	TP_2^c
^a Falsch positiv mit dem Referenzverfahren ^b Richtig positiv bei Konzentration 1 mit dem Referenzverfahren ^c Richtig positiv bei Konzentration 2 mit dem Referenzverfahren			

Tabelle 6 — Positivergebnisse mit dem alternativen Verfahren

Laboratorien	Konzentration der Kontamination		
	L_0	L_1	L_2
Laboratorium 1	/8	/8	/8
Laboratorium 2	/8	/8	/8
Laboratorium 3	/8	/8	/8
usw.	/8	/8	/8
Gesamt	FP^a	TP_1^b	TP_2^c
^a Falsch positiv mit dem alternativen Verfahren ^b Richtig positiv bei Konzentration 1 mit dem alternativen Verfahren ^c Richtig positiv bei Konzentration 2 mit dem alternativen Verfahren			

5.2.2.2 Für die Konzentration L_0 und für jedes Verfahren wird die prozentuale Spezifität SP nach Gleichung (1) berechnet:

$$SP = \left(1 - \left(\frac{FP}{N_-} \right) \right) \times 100 \% \quad (1)$$

Dabei ist

N_- die Gesamtanzahl aller Untersuchungen von L_0 ;

FP die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse.

5.2.2.3 Für jede Konzentration der Kontamination und für jedes Verfahren wird die prozentuale Empfindlichkeit SE nach Gleichung (2) berechnet:

$$SE = \frac{TP}{N_+} \times 100 \% \quad (2)$$

Dabei ist

N_+ die Gesamtanzahl aller Untersuchungen von L_1 bzw. L_2 ;

TP die Anzahl der richtig positiven Ergebnisse.

5.2.2.4 Für jede Konzentration der Kontamination und für die Gesamtheit der Ergebnisse werden das alternative Verfahren und das Referenzverfahren verglichen, um die relative Genauigkeit zu berechnen und die diskordanten Ergebnisse zu untersuchen.

Jedes Ergebnispaar einer Probe, die mit dem alternativen und dem Referenzverfahren untersucht wurde, wird nach Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7 — Ergebnispaaire des alternativen Verfahrens und des Referenzverfahrens im Ringversuch

Alternatives Verfahren	Referenzverfahren		Gesamt
	+	–	
+	PA	PD	
–	ND	NA	
gesamt	N_+	N_-	N

Die als Prozentsatz ausgedrückte relative Genauigkeit wird nach Gleichung (3) berechnet:

$$AC = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100 \% \quad (3)$$

Dabei ist

N die Anzahl der untersuchten Proben (für die Konzentration L_i oder für alle Konzentrationen);

PA die Anzahl der positiven Übereinstimmungen;

NA die Anzahl der negativen Übereinstimmungen.

5.2.2.5 Für jedes Verhältnis werden die Vertrauensintervalle berechnet (siehe 5.1.1.3.2).

5.2.2.6 Die diskordanten Ergebnisse werden wie in Anhang F beschrieben untersucht, wobei die Anzahlen von PD und ND verwendet werden (siehe Tabelle 7).

5.2.3 Interpretation

AC (Tabelle 7), SE und SP (Tabellen 5 und 6) und ihre relativen Gegenstücke, die innerhalb des Ringversuchs ermittelt wurden, werden unter Einbeziehung der natürlich kontaminierten Proben und der relativen Nachweisgrenze verglichen.

Diese Kriterien spiegeln eigentlich nicht die Schwankungen des Verfahrens innerhalb eines Laboratoriums und zwischen den Laboratorien wider (begrifflich: Wiederholpräzision und Vergleichpräzision). Anhang L liefert weitere Kriterien (Übereinstimmung, Konkordanz und Konkordanz odds ratio), die bei der Erfassung dieser Schwankungen helfen könnten (die Kriterien der Wiederholpräzision und Vergleichpräzision wurden für quantitative Verfahren festgelegt und können nicht in diesem Sinn für qualitative Verfahren verwendet werden).

6 Quantitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für ihre Validierung

6.1 Allgemeines

Die Anzahl der aus einer gegebenen Probe gewachsenen Kolonien ist das häufigste Ergebnis quantitativer Referenzverfahren, und alle Angaben dazu sollten aufgezeichnet werden – Probenmasse, Verdünnungsreihen, Volumen des Impfansatzes und die Anzahl der Kolonien bei jeder Verdünnung. In der Mikrobiologie sind diese *Einzel*ergebnisse oft unscharf, zum Beispiel, indem nur Platten mit weniger als 300 Kolonien gezählt werden und dann ein dem Verdünnungsfaktor reziproker Multiplikationsfaktor angewandt wird, um das Ergebnis zu erzielen. Aus diesem Grunde und wegen anderer in den Wachstumsprozess der Mikroorganismen eingreifender Faktoren, und auch um eine symmetrische oder eine annähernd normale Verteilung zu erhalten, werden die Daten für die Keimzahlen oft in ihre Logarithmen transformiert, oder es erfolgt eine Quadratwurzelttransformation. Diese Transformation kann durch Anwendung von Histogrammen mit vielen unter denselben Bedingungen gewonnenen Datenpunkten (30 oder mehr) überprüft werden.

In 6.2 und 6.3 über die Validierung quantitativer Verfahren wird hauptsächlich die Sammlung **kontinuierlicher Daten** (oder *Intervall*daten) beschrieben; **Bemerkungen zu den Keimzahlen** sind jedoch als besonderer Teil in die Norm eingefügt.

6.2 Vergleichsverfahren

6.2.1 Linearität und relative Genauigkeit

6.2.1.1 Begriffe

6.2.1.1.1

Linearität

die Eignung des Verfahrens, bei Anwendung auf eine gegebene Matrix Ergebnisse zu erbringen, die der in der Probe anwesenden Menge des Analyts proportional sind, das heißt, dass eine Zunahme der Menge des Analyts einem linearen oder proportionalen Anwachsen des Ergebnisses entspricht

ANMERKUNG 1 Eine **Antwortkurve** oder **Signalfunktion** entsteht, wenn das Verhältnis zwischen dem **Signal** oder der **Antwortreaktion** des Verfahrens und der **Konzentration des Analyts** (seinen Dosen) in unterschiedlichen Proben von **Referenzmaterialien (RM)** mit **bekannten Werten** bestimmt wird. In der Mikrobiologie, wo praktisch kein stabiles Referenzmaterial zur Verfügung steht, können diese „bekannten Werte“ durch eine große Anzahl von Mehrfachuntersuchungen mit dem **Referenzverfahren** bestimmt werden.

Nach dem Angleichen oder Glätten der Daten oder der Anwendung eines sonstigen Algorithmus sollte der Erarbeiter des alternativen Verfahrens ein *monotones* Modell über den gesamten Anwendungsbereich des Verfahrens aufstellen, damit die Messergebnisse in die den Bezugswerten am nächsten liegenden Werte transformiert werden können. Das angegliche Modell ist eine **erste (oder originale) Kalibrierkurve**, wobei alle **Kalibrierfaktoren** über den Bereich der Konzentration gesammelt werden; sie ist oft nicht linear. Aber dies ist kein Teil der Validierungsuntersuchung.

Ein Teil der Validierung ist die **Verifizierung der Kalibrierung**, was eine **endgültige Kalibrierkurve** ergibt, die das Verhältnis zwischen den transformierten Messwerten und den entsprechenden „Bezugswerten“²⁾ bei gleichem Einheitensystem festlegt. Bei gleichem Achsenmaßstab sollte diese Kurve linear sein, mit einem **Ordinatenabschnitt** von Null (die gleichen niedrigsten Werte), einem **Anstieg** von 1 (bei gleichen Achseneinheiten) und gut eingeschätzten Streucharakteristika. Eine Extrapolation oberhalb und unterhalb der geprüften Konzentrationen sollte nicht erfolgen, außer wenn es erforderlich ist, das Verhalten in der Nähe der Konzentration „Null“ zu untersuchen.

ANMERKUNG 2 Bei Verwendung der Keimzahlen für das folgende Regressionsverfahren wird die Linearität für Keimzahlen bei geringen Konzentrationen oder mit einem breiten Spektrum nicht korrekt bestimmt. Diese Keimzahlen besitzen eine Quasi-Poisson'sche Verteilung mit einer Wiederholstandardabweichung, die proportional der Wurzel aus dem Mittelwert der Keimzahlen ist. Das ist mit derselben Art von Schwierigkeiten bei der Schätzung verbunden, wie in der Anmerkung in Abschnitt 6.2.1.3.1 erwähnt.

6.2.1.1.2

Genauigkeit

das Ausmaß der Annäherung zwischen einem Ermittlungsergebnis und dem anerkannten Bezugswert [ISO 3534-1]

ANMERKUNG Wird der Ausdruck „Genauigkeit“ auf eine Serie von Ermittlungsergebnissen angewendet, umfasst er eine Kombination von Zufallskomponenten sowie eine gemeinsame systematische Abweichung oder eine gemeinsame Abweichungskomponente.

6.2.1.1.3

Systematische Abweichungskomponente

die Differenz zwischen dem Erwartungswert der Ermittlungsergebnisse und einem anerkannten Bezugswert [ISO 3534-1]

ANMERKUNG Die systematische Abweichungskomponente ist die Gesamtheit der systematischen Abweichungen im Gegensatz zur zufälligen Abweichung. Es können eine oder mehrere systematische Abweichungen zur systematischen Abweichungskomponente beitragen. Ein größerer systematischer Unterschied zum anerkannten Bezugswert spiegelt sich in einem größeren Wert der systematischen Abweichungskomponente wider.

6.2.1.1.4

Relative Genauigkeit

Siehe 5.1.1.1.1

6.2.1.2 Untersuchungsverfahren

6.2.1.2.1 Planung

Die Verifizierung der Kalibrierkurve erfordert viele unterschiedliche Proben (falls möglich, Referenzmaterialien; siehe Anhang C); und die Anzahl der untersuchten Merkmalsniveaus (Dosen oder Konzentrationen) ist eine Funktion des in der Praxis zu verwendenden Konzentrationsbereichs.

Für jeden Lebensmitteltyp ist ein Minimum von fünf unterschiedlichen **Konzentrationen** des Analyts für die Erstellung einer Kalibrierkurve erforderlich. Die Konzentrationen sollten **den gesamten** interessierenden **Bereich**³⁾ **gleichmäßig abdecken** und ein **Minimum** (Null oder anderer Wert), einen **Zentralwert**, ein **Maximum** und **zwei dazwischenliegende Werte** enthalten. Die **Wahl der Skale** muss vor der Auswahl der Konzentrationen erfolgen und das Kontaminationsspektrum sowie die erwartete Nachweisgrenze berücksichtigen: linear für kleine Bereiche (z. B. $< 3 \times \text{LOD}$ oder das 10fache bis 100fache von LOD) einschließlich Null, logarithmisch für große Bereiche (z. B. $> 3 \times \text{LOD}$). Das kann das Verhältnis zwischen den Standardabweichungen und den Mittelwerten der Antwortreaktionen beeinflussen (siehe Anmerkung in 6.2.1.3.1).

²⁾ Falls keine Referenzmaterialien und „bekannten“ Werte zur Verfügung stehen, werden sie aus der Anwendung des Referenzverfahrens bei natürlich kontaminierten Proben abgeleitet.

³⁾ Graphische Beispiele von unannehmbaren und annehmbaren Verteilungen von Messwerten sind in Anhang N angeführt.

Natürlich kontaminierten Proben wird Priorität eingeräumt. Der Begriff „Konzentration“ (level) wird hier als **a priori** geschätzte Konzentration des Analyts verwendet. Im Prinzip besteht eine optimale Planung für die Regression in der Wahl eines geeigneten und relevanten Konzentrationsbereichs des Analyts, oder indem man keine Proben mit ähnlichen Keimzahlen untersucht oder sich wiederholende Daten mit ähnlichen Ergebnissen ausschaltet. Bei Flüssigkeiten könnte der Bereich auch durch Verdünnungen erarbeitet werden; es müssen jedoch viele Vorsichtsmaßnahmen hinsichtlich der Homogenität sowohl fester als auch flüssiger Proben berücksichtigt werden.

Bei den Proben der gleichen Konzentration muss unabhängig voneinander durch Herstellung von Unterproben eine **Mehrfachbestimmung** erfolgen, und die gleiche Anzahl von Unterproben muss auf jeder Konzentrationsstufe untersucht werden – mindestens 2 und idealerweise 5 bis 10. Wenn sowohl beim Referenzverfahren als auch beim alternativen Verfahren die gleiche Dezimalverdünnung einer Unterprobe verwendet wird, erfolgt die Untersuchung auf der Stufe der Petrischalenbeimpfung (Anhang M, Fall 1) als Doppelbestimmung. Wenn nur beim Referenzverfahren Dezimalverdünnungen erforderlich sind, erfolgt die Doppelbestimmung auf der Ebene der Proben (Anhang M, Fall 2).

Die Petrischalen werden als Doppelbestimmung mit jeder Dezimalverdünnung beimpft.

Deshalb müssen für die Verifizierung einer Kalibrierkurve mindestens zehn Bestimmungen (idealerweise 25 bis 50 unter Verwendung natürlich kontaminierter Proben) mit dem alternativen Verfahren erfolgen.

Falls Proben von Referenzmaterialien nicht verfügbar sind, ist es nicht möglich, die **Genauigkeit** des alternativen Verfahrens korrekt abzuschätzen, sondern nur eine **relative Genauigkeit** durch Untersuchung der gleichen Unterproben nach dem Referenzverfahren.

6.2.1.2.2 Lebensmittelkategorien

Die Anzahl der zu untersuchenden Lebensmittelkategorien beträgt 5. Diese Anzahl darf auf 1, 2 oder 3 Kategorien verringert werden, falls das alternative Verfahren nur für diese festgelegten Kategorien (z. B. Milchprodukte) validiert werden soll. Die empfohlenen Kategorien sind in Anhang B aufgeführt.

Die Proben müssen mit dem in der Untersuchung behandelten Analyt **natürlich kontaminiert** sein.

In geeigneten Fällen dürfen Umweltproben verwendet werden, jedoch nur als eine Kategorie angesehen werden (siehe Anhang B).

Es ist wünschenswert, dass Lebensmittelproben aus einem möglichst großen Verbreitungsgebiet kommen, um eine systematische Abweichung aufgrund örtlich vorkommender Lebensmittelspezialitäten zu verringern und den Bereich der Validierung zu erweitern.

Das Spektrum der Kontamination muss gut über den gesamten zu untersuchenden quantitativen Bereich verteilt sein.

Falls es nicht möglich ist, für die erforderlichen Konzentrationsbereiche eine ausreichende Anzahl natürlich kontaminierter Proben zu beschaffen, ist die **künstliche Kontamination** einiger Proben erlaubt; ihre Anzahl muss jedoch eine Minderheit unter allen untersuchten Proben darstellen. Das Verfahren der künstlichen Kontamination muss zu Proben führen, bei denen die Merkmale des Analyts denen in natürlich kontaminierten Proben so ähnlich wie möglich sind (siehe Anhang C, 2. und 3. Option).

Deshalb ergeben sich, wenn 5 Lebensmittelkategorien und mindestens fünf Konzentrationen des Zielanalyts sowohl mit dem Referenzverfahren als auch mit dem alternativen Verfahren untersucht werden, und bei jeder Probe die gleiche Anzahl von Mehrfachuntersuchungen (2 bis 10) durchgeführt wird, insgesamt 10 bis 50 Bestimmungen je Verfahren und je Lebensmittelkategorie. Wenn die erhaltenen Ergebnisse nahe legen, dass die Matrix, entweder wegen der Zusammensetzung ihrer Bestandteile oder wegen Schwankungen der Konzentration des Zielkeims innerhalb der Matrix, nicht homogen ist, müssen weitere Proben untersucht werden.

Nach der **getrennten Bewertung jeder Lebensmittelkategorie** ist die **Gesamtbewertung** der Kalibrierkurve für alle Kategorien eine nützliche Maßnahme, um jede Diskrepanz zwischen dem Anwendungsbereich, der Genauigkeit und der Streuung der Wiederholpräzision innerhalb des Gesamtbereichs des Analyts festzustellen.

6.2.1.3 Berechnungen

6.2.1.3.1 Allgemeines

Bevor irgendwelche Berechnungen angestellt werden, wird eine **Kurve** der Werte als zweidimensionale Punktdarstellung für das Referenz- und das alternative Verfahren für jede Probe durchgeführt; dabei wird die **y-Achse (vertikal) für das alternative Verfahren** und die **x-Achse (horizontal) für das Referenzverfahren** verwendet. Die Punkte für jede Konzentration des Analyts sollten eine *einzelne abgegrenzte Häufung* bilden. Um **Ausreißer** und eine **Nichtlinearität** aufzudecken, wird die Kurve auf das Vorhandensein etwaiger **anomaler Ergebnisse** besichtigt; das sind solche, die eindeutig außerhalb jeder Häufung liegen. Wenn diese vorhanden sind, wird die Probe nach Möglichkeit neu untersucht, und wenn keine Erklärung geliefert werden kann oder das Ergebnis wieder außerhalb der Häufung liegt, wird dieses Ergebnis vorübergehend verworfen und die unten angeführten Berechnungen werden wiederholt, um die Auswirkung im Gegensatz zu den Berechnungen mit allen Daten einzuschätzen. Wenn eine Auswirkung von Verdünnungen an der Besonderheit beteiligt ist, wird dieser Punkt sorgfältig untersucht.

Wenn alles richtig erscheint, wird ein Programm zur linearen Regression⁴⁾ angewandt, aus dem sich die Wahrscheinlichkeit eines **Anpassungsmangels** oder einer **Nichtlinearität** ergibt und mit dem es auch möglich sein kann, die **Regression ungleich zu wichten** (siehe ISO 11095). Für den Fall, dass ein weniger entwickeltes Rechenprogramm oder eine geringere Computerkapazität zur Verfügung steht, sind die erforderlichen Berechnungen in 6.2.1.3.2 angegeben.

WARNUNG — Wenn eine einfache lineare Regression eine Übereinstimmung in Form einer Geraden ($y = a + bx$) ergibt, ist ihr Korrelationskoeffizient r nicht ausreichend, um die erforderliche Information zu erbringen. Die statistische Signifikanz von r oder des Anstiegs b ist kein Synonym für die Linearitätsprüfung. Darüber hinaus müssen die beiden Hypothesen ($a = 0$ und $b = 1$) geprüft werden.

ANMERKUNG Wenn der Fehler der Wiederholpräzision für y (oder auch für x) vom Wert y abhängt (das ist unglücklicherweise sehr oft der Fall), d. h. es ein direkt proportional wachsender Fehler ist, ist es besser, eine geglättete **Wichtungsfunktion** (z. B. $Wichtung [y] = \text{konstant}/\text{Varianz} = \text{konstant}/y^2$) anzuwenden, um die Gerade $y = a + bx$ durch das Verfahren der linearen Regression korrekt anzupassen (ähnlich einem **WLS-Verfahren** für gewichtete kleinste Quadrate — WLS = weighted least squares). Dies bringt die Gerade näher an die beobachteten Punkte, die eine geringere Streuung aufweisen, und bringt sie in weiteren Abstand, wenn die Streuung größer ist: die Schätzwerte des Anstiegs b und des Kurvenabschnitts a sind deshalb stark von diesem Wichtungsverfahren abhängig. Das ist ein schwieriges und rein technisches Thema, hauptsächlich für die Anwendung durch Statistiker, und es wird deshalb in dieser Norm EN ISO 16140 nicht entwickelt. Es kann statistische Literatur verwendet werden, die die Allgemeine Lineare Modellierung GLIM/GLM (General Linear Modelling) usw. beschreibt (siehe ISO 11095). Demzufolge wird, wenn sich nach der Sammlung der Daten und der Untersuchung der Regressionskurven eine fragliche Linearität ergibt, empfohlen, das Fachwissen eines Statistikers für diese Analyse zu nutzen.

6.2.1.3.2 Schätzungen mit Hilfe des Regressionsverfahrens

6.2.1.3.2.1 Prinzip des Regressionsverfahrens

Im allgemeinen Fall wird die vertikale **y-Achse (abhängige Variable)** für das **alternative Verfahren** und die horizontale **x-Achse (unabhängige Variable)** für das **Referenzverfahren** verwendet. Diese unabhängige Variable x muss sehr genau und präzise sein sowie gut bekannte Werte aufweisen.

Wenn angenommen wird, dass ein Fehler der Wiederholpräzision $s_r(x)$ für x auftreten kann, der fast vergleichbar mit oder größer als $s_r(y)$ ist, können die Angleichfunktionen $y(x)$ oder $x(y)$ zu ganz unterschiedlichen Geraden führen. Für den Fall, dass die Wiederholstandardabweichungen $s_r(x)$ und $s_r(y)$ vergleichbar sind (bzw. für x und y), werden andere Schätzwerte berechnet (siehe Anhang R.3). Wenn die Werte $s_r(x)$ viel größer als die Werte $s_r(y)$ sind, werden die Achsen von x gegen y und von y gegen x ausgetauscht, um eine Regressionsuntersuchung $y(x)$ durchzuführen, oder es wird die Regression $x(y)$ ohne den Austausch (Permutation) (siehe Anhang R.4) der Achsen durchgeführt. Wenn dies gewählt wird, (siehe Anhang R.2), wird ein Schnittpunkt von 2 für das Verhältnis der Fehler der Wiederholpräzision von x und y oder deren Reziprokwert verwendet.

Zu Berechnungen siehe Anhang R.

⁴⁾ Oder ein Tabellenkalkulationsprogramm wie **Excel**.