

	Wasserbeschaffenheit Richtlinie zur Validierung mikrobiologischer Verfahren (ISO/TR 13843:2000) Deutsche Fassung ENV ISO 13843:2001	Vornorm DIN V ENV ISO 13843
--	---	---

ICS 07.100.20

Water quality — Guidance on validation of microbiological methods (ISO/TR 13843:2000); German version ENV ISO 13843:2001

Qualité de l'eau — Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques (ISO/TR 13843:2000); Version allemande ENV ISO 13843:2001

Eine Vornorm ist das Ergebnis einer Normungsarbeit, das wegen bestimmter Vorbehalte zum Inhalt oder wegen des gegenüber einer Norm abweichenden Aufstellungsverfahrens vom DIN noch nicht als Norm herausgegeben wird.

Zur vorliegenden Vornorm wurde kein Entwurf veröffentlicht. Erfahrungen mit dieser Vornorm sind erbeten an den Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin).

Diese Vornorm ist Bestandteil der Reihe

Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung — Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

und beschreibt das Verfahren

Richtlinie zur Validierung mikrobiologischer Verfahren (K 2).

Nationales Vorwort

Diese Europäische Vornorm ENV ISO 13843 ist vom Technischen Komitee TC 230 „Wasseranalytik“ des Europäischen Komitees für Normung (CEN) ausgearbeitet worden. Im DIN Deutsches Institut für Normung e.V. war hierfür der Arbeitsausschuss NAW I 3 „Wasseruntersuchung“ zuständig.

Die Veröffentlichung erfolgt als Vornorm, um der Fachwelt eine ausreichend lange Zeit zur Erprobung einzuräumen.

Die deutsche Öffentlichkeit wird aufgefordert, zu dieser Vornorm Stellung zu nehmen, damit die gesammelten Änderungswünsche von Deutschland bei CEN/TC 230 eingebracht werden können.

In Abschnitt 2.16 des ISO/TR 13843 ist die Formel b) fehlerhaft. Sie muss wie folgt lauten:

b) Berechnung von x über negative Binomialverteilung

$$x = \frac{(p_0^{-u^2} - 1)}{u^2} = \frac{0,05^{-u^2} - 1}{u^2} = \frac{20^{u^2} - 1}{u^2}$$

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Vornorm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten.

Fortsetzung Seite 2
und 64 Seiten ENV

Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall ja nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die als DIN-Normen veröffentlichten Einheitsverfahren sind beim Beuth Verlag einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Einheitsverfahren in der Loseblatt-Sammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam vom Beuth Verlag GmbH und von dem Wiley-VCH Verlag publiziert.

Alle für die Abwasserverordnung (AbwV) — enthalten in der neuen Verordnung zu § 7a des Gesetzes zur Ordnung des Wasserhaushaltes (WHG) über „Anforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer und zur Anpassung des Abwasserabgabengesetzes“ — relevanten Einheitsverfahren sind zusammen mit der AbwV und dem WHG und allen noch fortgeltenden Abwasserverwaltungsvorschriften als Loseblatt-Sammlung „Analyseverfahren in der Abwasserverordnung — Rechtsvorschriften und Normen“ mit dem Ergänzungsband 1 (DIN-Normen) und dem Ergänzungsband 2 (DIN-EN- und DIN-EN-ISO-Normen) herausgegeben worden.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel
„Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“
sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)	(DIN 38402)
Sensorische Verfahren (Gruppe B)	(DIN 38403)
Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)	(DIN 38404)
Anionen (Gruppe D)	(DIN 38405)
Kationen (Gruppe E)	(DIN 38406)
Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)	(DIN 38407)
Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)	(DIN 38408)
Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)	(DIN 38409)
Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)	(DIN 38410)
Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)	(DIN 38411)
Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)	(DIN 38412)
Einzelkomponenten (Gruppe P)	(DIN 38413)
Schlamm und Sedimente (Gruppe S)	(DIN 38414)
Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)	(DIN 38415)

Außer den in der Reihe DIN 38402 bis DIN 38415 genormten Untersuchungsverfahren liegen eine Reihe Europäischer und Internationaler Normen als DIN-EN-, DIN-EN-ISO- und DIN-ISO-Normen vor, die ebenfalls Bestandteil der „Deutschen Einheitsverfahren“ sind.

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Telefon (0 30) 26 01 - 25 49, oder der Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstraße 6, 10787 Berlin), Auskunft.

Deutsche Fassung

Wasserbeschaffenheit

**Richtlinie zur Validierung mikrobiologischer Verfahren
(ISO/TR 13843:2000)**

Water quality — Guidance on validation of microbiological methods (ISO/TR 13843:2000)

Qualité de l'eau — Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques (ISO/TR 13843:2000)

Diese Europäische Vornorm (ENV) wurde vom CEN am 7. April 2001 als eine künftige Norm zur vorläufigen Anwendung angenommen.

Die Gültigkeitsdauer dieser ENV ist zunächst auf drei Jahre begrenzt. Nach zwei Jahren werden die Mitglieder des CEN gebeten, ihre Stellungnahmen abzugeben, insbesondere über die Frage, ob die ENV in eine Europäische Norm umgewandelt werden kann.

Die CEN-Mitglieder sind verpflichtet, das Vorhandensein dieser ENV in der gleichen Weise wie bei einer EN anzukündigen und die ENV auf nationaler Ebene unverzüglich in geeigneter Weise verfügbar zu machen. Es ist zulässig, entgegenstehende nationale Normen bis zur Entscheidung über eine möglichen Umwandlung der ENV in eine EN (parallel zur ENV) beizubehalten.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, der Tschechischen Republik und dem Vereinigten Königreich.



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

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	3
2 Begriffe	4
3 Gliederung des Dokumentes	13
4 Grundlagen	13
4.1 Allgemeines	13
4.2 Validierung	14
4.3 Nachweissysteme	17
4.4 Verfahrenskennndaten	18
4.5 Kenngrößen	18
5 Limitierungen und typische Merkmale mikrobiologischer Verfahren	19
5.1 Wiederfindung des Untersuchungsobjektes	19
5.2 Probenvarianz	19
5.3 Partikelverteilung und Überdispersion	19
5.4 Wechselbeziehungen innerhalb des Nachweissystems	20
5.5 Robustheit	20
5.6 Pseudofehler	21
5.7 Kontroll- und Leitkarten	21
6 Mathematische Variationsmodelle	22
6.1 Unvermeidbare grundlegende Variation — die Poisson-Verteilung	22
6.2 Überdispersion — das negative Binomial-Modell	26
6.3 Statistische Grenzen und praktische Grenzen	30
6.4 Allgemeine Zufälligkeitstests — Nachweis der Überdispersion	31
7 Kenngrößen — gebräuchliche Praxis	31
8 Kenngrößen — empfohlene Vorgehensweise	33
9 Bestimmung und Angabe der Verfahrenskennndaten	34
9.1 Allgemeines	34
9.2 Kategoriale Merkmale im Zusammenhang mit Spezifität und Selektivität	34
9.3 Arbeitsgrenzen	36
9.4 Arbeitsbereich der MPN-Verfahren	37
9.5 Präzision	37
10 Durchführung und Schritte der Validierung	39
10.1 Allgemeines	39
10.2 Primäre Validierung	39
10.3 Sekundäre Validierung	41

	Seite
11 Versuchsaufbau zur Bestimmung der Kenngrößen	41
11.1 Ein allgemeines Modell für grundlegende quantitative Kenngrößen ...	41
11.2 Präzision des gesamten analytischen Verfahrens	42
11.3 Kategoriale Merkmale	42
11.4 Ungeplant erhobene Daten	43
Anhang A Statistische Verfahren und Computerprogramme	44
Anhang B Numerische Beispiele	48
Anhang C Beispiel für ein Validierungsexperiment	62
Literaturhinweise	63

Vorwort

Der Text des Technischen Berichts vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ der „International Organization for Standardization“ (ISO) wurde als Europäische Vornorm durch das Technische Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ übernommen, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Diese Europäische Vornorm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis spätestens November 2001, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 2001 zurückgezogen werden.

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, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, die Tschechische Republik und das Vereinigte Königreich.

Anerkennungsnotiz

Der Text des Technischen Berichts ISO/TR 13843:2000 wurde vom CEN als Europäische Vornorm ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Vornorm befasst sich mit der Validierung mikrobiologischer Verfahren, mit besonderem Schwerpunkt auf selektive quantitative Verfahren, bei denen die quantitative Abschätzung auf der Auszählung von Partikeln beruht, entweder direkt mit Hilfe eines Mikroskops oder indirekt durch Wachstum (Vermehrung) zu Kolonien oder Trübung.

Die Grundlagen und Verfahren in diesem Anwendungsbereich sind allgemein bekannt als presence/absence (P/A), wahrscheinlichste Zahl (most probable number, MPN), Koloniezählung und direkte (mikroskopische) Zählung.

Diese Europäische Vornorm ist nicht anwendbar auf die Validierung von so genannten schnellen oder modernen Verfahren, die meist von der Messung von Produkten oder Änderungen aufgrund mikrobieller Aktivität abhängen, aber nicht den Nachweis einzelner Partikel ansprechen.

2 Begriffe

Für die Anwendung dieser Europäischen Vornorm gelten die folgenden Begriffe:

2.1

Genauigkeit einer Messung

die Nähe der Übereinstimmung zwischen dem Ergebnis einer Messung und dem akzeptierten Referenzwert

ANMERKUNG Wird der Begriff „Genauigkeit“ auf eine Reihe von Testergebnissen angewandt, so beinhaltet er eine Zufallskomponente und einen allgemeinen systematischen Fehler oder Biaskomponente.

[ISO 3534-1:1993, 3.11]

2.2

Untersuchungsobjekt

Messgröße

bestimmte Menge, die Gegenstand der Messung ist

ANMERKUNG 1 Siehe Literaturhinweise [5].

ANMERKUNG 2 In der Mikrobiologie ist das Untersuchungsobjekt idealerweise als eine Reihe taxonomisch beschriebener Arten definiert. In der Praxis kann das Untersuchungsobjekt in vielen Fällen nur über Gruppenmerkmale bestimmt werden, die ungenauer sind als die taxonomischen Definitionen.

2.3

Untersuchungsvolumen

Probenvolumen

Volumen einer Suspension von Partikeln, die in eine Einheit des Nachweissystems geimpft wird

ANMERKUNG Beispiele für eine Einheit eines Nachweissystems sind Agarplatte, Membranfilter, Teströhrchen, Quadrat eines mikroskopischen Zählgitters.

2.4

Anwendungsbereich

Bereich von Partikelkonzentrationen, der routinemäßig der Messung mit einer Methode unterworfen wird

2.5

kategoriale Merkmale

Verfahrenskennndaten, die numerisch als relative Häufigkeit basierend auf einer P/A- oder +/- -Klassifizierung ausgedrückt werden

2.6

KBE, koloniebildende Einheit, KBP, koloniebildendes Partikel,

ANMERKUNG Die Bezeichnung wurde ursprünglich eingeführt um die Vorstellung zu vermitteln, dass eine Kolonie nicht nur von einer einzigen Zelle stammen kann, sondern von einer festen Kette oder einem Aggregat von Zellen, einer Sporenanhäufung, einem Stück Myzelium, usw. Es setzt fälschlicherweise die Zahl der beobachteten Kolonien gleich mit der Zahl lebender Einheiten, die auf ein Medium geimpft wurden. Wachstumseinheit, lebendes Partikel, Fortpflanzungseinheit (2.27) und Keim (2.13) sind Begriffe mit derselben Bedeutung, die aber die ursprüngliche Vorstellung besser vermitteln und sich nicht nur auf Koloniezählungsverfahren, sondern ebenso auf MPN- und P/A-Verfahren anwenden lassen.

2.7

Variationskoeffizient

CV

Relative Standardabweichung (RSD), für nicht-negative Merkmale, das Verhältnis der Standardabweichung vom Durchschnitt

ANMERKUNG 1 Das Verhältnis kann als Prozentsatz ausgedrückt werden.

ANMERKUNG 2 Der Begriff „relative Standardabweichung“ wird manchmal als Alternativbegriff zu „Variationskoeffizient“ benutzt; diese Anwendung wird jedoch nicht empfohlen.

[ISO 3534-1:1993, 2.35]

ANMERKUNG 3 In dieser Europäischen Vornorm wird der Begriff Variationskoeffizient (CV) benutzt, wenn die relative Standardabweichung in Prozent ausgedrückt wird ($CV \% = 100 \text{ RSD}$).

2.8

Ringversuch

Untersuchungen zur Laborleistungsfähigkeit, an denen verschiedene Laboratorien an einem Experiment teilnehmen, das von einem leitenden Labor geplant und koordiniert wird

ANMERKUNG Es gibt im Wesentlichen zwei Arten von Ringversuchen. Laborleistungsfähigkeitstests (Intercalibrierungen) werden durchgeführt, um Laboratorien einen Vergleich ihrer analytischen Ergebnisse mit denen der anderen teilnehmenden Laboratorien zu ermöglichen.

Verfahrensleistungsfähigkeitsversuche ergeben Präzisionsschätzungen (Wiederhol- und Vergleichpräzision) anhand von Daten, die anfallen, wenn verschiedene teilnehmende Laboratorien identisches Probenmaterial mit einem genau standardisierten Verfahren untersuchen.

2.9

bestätigte (verifizierte) Koloniezahl

x

Anzahl verdächtiger Kolonien, korrigiert um falsch-positive Ergebnisse

$$x = pc = \frac{k}{n} c$$

Dabei ist:

c die Zahl verdächtiger Kolonien;

p die Rate der Echt-Positiven-Ergebnisse;

n die Zahl der verdächtigen Kolonien, die zur Bestätigung isoliert wurden;

k die Zahl der bestätigten Kolonien.

2.10

Kontrollkarte

zweidimensionales Punktdiagramm zur Überwachung der Leistungsfähigkeit von Verfahren mit Kontrollwerten, die durch eine Typ-A-Studie erhalten wurden

ANMERKUNG Auf Kontrollkarten ist die horizontale Achse üblicherweise eine Zeitskala oder gibt eine Reihenfolge an, und die Kontrollvariable ist das arithmetische Mittel oder ein Präzisionsmaß (s, CV, RSD).

2.11

Nachweissystem

(Partikelnachweissystem)

eine Platte mit fester Matrix oder ein Röhrchen mit flüssigem Nährmedium zur Zählung oder zum Nachweis lebender mikrobieller Partikel

2.12

Nachweisreihe

(Nachweissystemreihe)

Kombination von Platten oder Röhrchen, auf denen die quantitative Schätzung der mikrobiellen Probenkonzentration basiert

ANMERKUNG Die Nachweisreihe ist der Satz an Platten oder Röhrchen, der für die zahlenmäßige Schätzung eines einzelnen Wertes verwendet wird.

BEISPIELE Parallelplatten einer Suspension, Platten aufeinander folgender Verdünnungen, 3 × 5-Röhrchen-MPN-System, Mikrotiterplatte.

2.13

Keim

eine lebende Einheit, fähig, Wachstum in einem Nährmedium entstehen zu lassen

Synonym: **Fortpflanzungseinheit** (2.27)

2.14

Leitkarte

zweidimensionales Punktdiagramm zur Darstellung von Verfahrenskenndaten (Quantität oder Präzision) mit willkürlichen Leitwerten oder Leitwerten, die durch einen Typ-B-Ansatz erhalten wurden

ANMERKUNG In Leitkarten gibt die horizontale Achse üblicherweise die Koloniezahl je Nachweissystem an.

2.15

heterogene (oder zusammengesetzte) Poisson-Verteilung

eine Verteilung, die entsteht, wenn der Mittelwert einer Poisson-Verteilung von einem Ereignis zum Anderen zufällig variiert

ANMERKUNG 1 Siehe Literaturhinweise [11].

ANMERKUNG 2 Siehe auch negative Binomial-Verteilung (2.19).

2.16

Nachweisgrenze

Partikelzahl x (pro Untersuchungsvolumen), bei der die Wahrscheinlichkeit p_0 eines negativen Resultats 5 % beträgt

ANMERKUNG 1 Die Wahrscheinlichkeit eines positiven Resultats ist $p(+) = 1 - p_0$.

ANMERKUNG 2 a) Berechnung von x über Poisson-Verteilung

$$x = \ln\left(\frac{1}{p_0}\right) = \ln\left(\frac{1}{0,05}\right) = \ln(20) = 3,00$$

b) Berechnung von x über negative Binomial-Verteilung

$$x = \frac{(p_0^{-u^2} - 1)}{u^2} = \frac{0,05^{-u^2} - 1}{u^2} = \frac{20^{u^2} - 1}{u^2}$$

2.17

Bestimmungsgrenze

niedrigste durchschnittliche Partikelkonzentration x pro Untersuchungsvolumen, bei der die erwartete relative Standardunsicherheit einem festgelegten Wert (RSD) entspricht

ANMERKUNG a) Berechnung über Poisson-Verteilung

$$x = \frac{1}{(RSD)^2}$$

b) Berechnung über negative Binomial-Verteilung:

$$x = \frac{1}{(RSD)^2 - u^2} \text{ gegebenem Überdispersions-Faktor } u$$

2.18

Linearität

lineare Abhängigkeit des Signals von der Konzentration des Untersuchungsobjektes

siehe **Proportionalität** (2.28)

2.19

negative Binomial-Verteilung

eine bestimmte statistische Verteilung von Zählwerten mit Überdispersion

ANMERKUNG 1 Ihre Varianz kann ausgedrückt werden als

$$\sigma^2 = \mu + u^2 \mu^2$$

dabei ist μ das arithmetische Mittel.

ANMERKUNG 2 In dieser Europäischen Vornorm wird das Quadrat des Überdispersionsfaktors (u) für den inversen Exponenten ($1/k$) in der Standardgleichung der negativen Binomial-Verteilung eingesetzt.

2.20

Überdispersion

über die der Poisson-Verteilung hinausgehende Zufalls-Variation

ANMERKUNG Qualitativ nachgewiesen mithilfe des Dispersionsindizes der Poisson-Verteilung und quantitativ bestimmt durch die Schätzung des Parameters u (Überdispersionsfaktor) der negativen Binomial-Verteilung.

2.21

Überdispersionsfaktor

u

zusätzliche zufällige Unsicherheit der Bestimmung, die über die Poisson-Verteilung hinausgeht und als relative Standardabweichung gemessen wird

2.22

Überlappungsfehler

Überfüllungsfehler

systematische Abnahme der Koloniezahlen, verursacht durch ein Ineinanderwachsen von Kolonien

ANMERKUNG Quantitativ hängt der Überlappungsfehler primär vom Anteil des verfügbaren Wachstumsraums ab, der von Koloniewachstum eingenommen wird.

2.23

Parallelzählungen

Partikel- oder Koloniezahlen in gleichen Untersuchungsvolumina, die aus derselben Suspension entnommen werden

2.24

Poisson-Verteilung

vollkommen zufällige Verteilung der Partikelzahlen bei Beprobung einer vollständig durchmischten Suspension

ANMERKUNG Die Wahrscheinlichkeit $P(k)$, genau k Einheiten in einem Testvolumen zu beobachten, wenn der Mittelwert μ ist, ergibt sich aus

$$P(k) = \frac{\mu^k}{k!} e^{-\mu}$$

2.25

Präzision

Nähe der Übereinstimmung zwischen unabhängigen Versuchsergebnissen, die unter festgelegten Bedingungen erhalten werden

ANMERKUNG Präzision bezieht sich nicht auf den wahren oder angegebenen Wert. Sie wird üblicherweise als Ungenauigkeit ausgedrückt und wird berechnet als Standardabweichung der Versuchsergebnisse.

2.26

primäre Validierung

vollständige Validierung

Festlegung der Spezifikation zur Durchführung eines neuen Verfahrens und/oder experimentelle Verifizierung, dass ein Verfahren theoretisch abgeleitete Qualitätskriterien erfüllt

2.27

Fortpflanzungseinheit

eine lebensfähige Einheit, vegetative Zelle, Gruppe von Zellen, Spore, Sporenanhäufung oder ein Stück eines pilzlichen Myzels, das zum Wachstum in einem Nährmedium befähigt ist

Synonym: **Keim** (2.13)

2.28

Proportionalität

Übereinstimmung der beobachteten Partikelzahlen mit dem Volumen (oder der Verdünnung) einer Reihe von Untersuchungsvolumina aus einer gemeinsamen Stammsuspension

ANMERKUNG Proportionalität wird für die statistische Evaluierung berechnet als die Log-Likelihood-Quotienten-Statistik G^2 mit $n-1$ Freiheitsgraden.

2.29

qualitatives Verfahren

ein analytisches Verfahren, dessen Ergebnis entweder die Anwesenheit oder die Abwesenheit des Untersuchungsobjektes in einer bestimmten Probenmenge ist

ANMERKUNG Siehe Literaturhinweise [10].

2.30

Wiederfindung

ein allgemeiner Begriff für die geschätzte Anzahl an bestimmten Partikeln in einer Untersuchungsmenge oder Probe, mit der Vorstellung, dass eine wahre (aber unbekannte) Partikelzahl existiert, von der 100 % oder weniger durch das Nachweissystem „wiedergefunden“ wird

2.31

relative Genauigkeit

das Maß an Übereinstimmung zwischen dem Ergebnis, das mit dem Referenzverfahren erhalten wurde und dem Ergebnis, das mit dem alternativen Verfahren mit identischem Probenmaterial gefunden wurde

ANMERKUNG Siehe Literaturhinweise [10].

2.32

relativer Unterschied

d

der Unterschied zweier Messwerte geteilt durch ihr arithmetisches Mittel

$$d = \frac{x_A - x_B}{\bar{x}} = \frac{2(x_A - x_B)}{x_A + x_B}$$

$$d\% = 100 d$$

ANMERKUNG Für alle praktischen Anwendungen resultiert derselbe Wert aus der Berechnung $d = \ln(x_A) - \ln(x_B)$

2.33

relative Wiederfindung

das Verhältnis (A/B) von Koloniezählungen, die mit zwei Verfahren bei gleichen Probemengen aus derselben Suspension erhalten werden, wobei B die Referenz ist (wenn anwendbar)

2.34

relative Standardabweichung (RSD)

eine Schätzung der Standardabweichung einer Population aus einer Stichprobe von n Ergebnissen dividiert durch das arithmetische Mittel dieser Probe

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$$

Siehe **Variationskoeffizient** (2.7)

2.35

Wiederholpräzision

Nähe der Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen aufeinander folgender Messungen desselben Messguts, ausgeführt unter denselben Messbedingungen

ANMERKUNG 1 Siehe *Guide to the expression of uncertainty in measurement* [6].

ANMERKUNG 2 Wiederholpräzision wird als $r = 2,8 s_r$ berechnet, dabei ist s_r die Standardabweichung unter Wiederholbedingungen.

2.36

Vergleichpräzision

Nähe der Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen von Messungen desselben Messguts, ausgeführt unter veränderten Messbedingungen

ANMERKUNG 1 Siehe *Guide to the expression of uncertainty in measurement* [6].

ANMERKUNG 2 Vergleichpräzision wird berechnet als $R = 2,8 s_R$.

Dabei ist:

s_R die Standardabweichung unter Vergleichbedingungen, die sich üblicherweise zusammensetzt aus der Standardabweichung zwischen Laboratorien s_L und der Standardabweichung unter Wiederholbedingungen s_r :

$$s_R = \sqrt{s_L^2 + s_r^2}$$

2.37

Robustheit

Unempfindlichkeit eines analytischen Verfahrens gegenüber kleinen Veränderungen des Verfahrensablaufs

ANMERKUNG 1 Siehe Literaturhinweise [23].

ANMERKUNG 2 Um die Robustheit zu untersuchen ist es ratsam, das Verfahren in kontrollierter Weise zu „missbrauchen“.

2.38

sekundäre Validierung

experimenteller Nachweis, dass ein eingeführtes Verfahren nach seinen Kenngrößen in der Hand des Anwenders funktioniert

2.39

scheinbare Selektivität

F

Verhältnis der Zahl an Zielkolonien zur Gesamtzahl an Kolonien im selben Probevolumen

$$F = \lg(t/n)$$

Dabei ist:

t die scheinbare Konzentration der verdächtigen Zieltypen, geschätzt durch Zählung von Kolonien;

n die Konzentration der Gesamtkolonien.

2.40

Sensitivität

Anteil positiver Kulturen oder Kolonien an der Gesamtzahl, die in der vorläufigen Untersuchung korrekt zugeordnet wurden

2.41

Spezifität

Anteil negativer Kulturen oder Kolonien an der Gesamtzahl, die in der vorläufigen Untersuchung korrekt zugeordnet wurden

2.42

Standardunsicherheit

Unsicherheit des Ergebnisses einer Messung, ausgedrückt als Standardabweichung

2.43

Typ-A-Beurteilung

(der Unsicherheit) Verfahren zur Beurteilung der Unsicherheit durch statistische Analyse einer Reihe von Beobachtungen

BEISPIEL Beobachtungen können z.B. Standardabweichung, relative Standardabweichung sein.

ANMERKUNG 1 Siehe Literaturhinweise [5] und [6].

ANMERKUNG 2 Wiederhol- und Vergleichpräzision werden oft durch die Durchführung von Ringversuchen abgeschätzt, bei denen verschiedene Laboratorien „identische“ Proben untersuchen, die von einem zentralen Organisator zur Verfügung gestellt werden [15].

2.44

Typ-B-Beurteilung

(der Unsicherheit) Verfahren zur Beurteilung der Unsicherheit durch andere Verfahren als die statistische Analyse einer Reihe von Beobachtungen z. B. ausgehend von angenommenen Wahrscheinlichkeitsverteilungen, die auf Erfahrungswerten oder anderen Informationen beruhen

ANMERKUNG Siehe Literaturhinweise [5] und [6].

2.45

Unsicherheit

(der Messung) ein mit dem Ergebnis einer Messung in Beziehung stehender Parameter, der die Streuung der Werte charakterisiert, die vernünftigerweise dem Messgut zugeordnet werden kann

ANMERKUNG Siehe Literaturhinweise [6].

2.46

Unsicherheit

(der Zählung) die relative Standardabweichung der Ergebnisse wiederholten Zählens der Kolonien oder Partikel derselben Platte(n) oder Felder unter festgelegten Bedingungen

BEISPIEL Festgelegte Bedingungen können z.B. dieselbe Person in einem Laboratorium oder verschiedene Personen in einem Laboratorium bzw. in verschiedenen Laboratorien sein.

2.47

Bereich der Validierung

Bereich der mittleren Anzahl an Partikeln pro Untersuchungsvolumen, für die annehmbar gezeigt wurde, dass die Validierungskenngrößen (insbesondere die Linearität) eingehalten werden

ANMERKUNG Er wird üblicherweise ausgedrückt als der Bereich der „zuverlässigen“ Koloniezahlwerte.

3 Gliederung des Dokumentes

Der erste Teil (Kapitel 4 bis 8) dieser Europäischen Vornorm enthält sowohl Informationsmaterial zu grundsätzlichen Prinzipien, Eigenschaften und Limitierungen mikrobiologischer Verfahren als auch zu allgemeinen Aspekten der Validierung. Die zweite Hälfte (Kapitel 9 bis 11) ist das eigentliche Validierungsdokument, das die Kenngrößen und vorgeschriebenen Verfahrensweisen zu ihrer Bestimmung enthält.

Alte und neue Vorstellungen und Grundlagen sind in dieser Europäischen Vornorm nicht vollständig erläutert. Es sind drei Anhänge angefügt. Anhang A gibt im Einzelnen die für dieses Dokument wichtigsten statistischen Formeln wieder, Anhang B enthält numerische Beispiele und Anhang C zeigt detaillierte Versuchspläne für zwei Validierungsexperimente auf.

Statistische Versuche im üblichen Sinne stehen hier nicht im Mittelpunkt. Mathematische Berechnungen werden hauptsächlich mit dem Ziel der Erstellung geeigneter Zusammenfassungen der Daten benötigt und statistische Verteilungen liefern Richtwerte. Eine Tabelle der χ^2 Verteilung ist das am meisten gebrauchte Nachschlagewerk.

Die beiden in Anhang A vorhandenen BASIC Programme können als Hilfe für die am häufigsten benötigten Grundberechnungen schnell in Desktop-Computer oder programmierbare Taschenrechner kopiert werden.

4 Grundlagen

4.1 Allgemeines

Mikroskopische Zellzahlen folgen, was die Partikelstatistik anbelangt, den gleichen Gesetzmäßigkeiten wie die Lebendzellzahlen, haben aber, mit Ausnahme der Mikrokolonieverfahren, nicht die biologischen Probleme, die mit dem Wachstum verbunden sind. Differenzierende Farbstoffe, spezifisch markierte Komplexe oder andere Verbindungen, die eingesetzt werden um die Zielorganismen zu finden, ändern nichts an den Messprinzipien. Es können die gleichen Validierungsgrundlagen angewendet werden, wie für die selektiven Verfahren der Koloniezahlbestimmung.

Plaques von Bakteriophagen ähneln in überwiegender Hinsicht den bakteriellen Koloniezahlen.

4.2 Validierung

4.2.1 Allgemeines

Validierung bezeichnet einen Prozess, der den Beweis erbringt, dass ein Verfahren für den ihr zugedachten Zweck geeignet ist, den Nachweis oder die Quantifizierung eines spezifischen Mikroorganismus oder einer Gruppe von Mikroorganismen mit ausreichender Präzision und Richtigkeit. Die Verfahren der Gesamtzellzahlbestimmungen haben keine definierbare Zielgruppe und können nur in Bezug auf andere Verfahren oder theoretische Erwartungen der Präzision validiert werden.

Validierung wird je nach der mit ihr verfolgten Absicht als primär oder sekundär bezeichnet.

4.2.2 Primäre Validierung

Primäre Validierung ist ein sondierender Prozess mit dem Ziel, die Arbeitsgrenzen und Verfahrenskenndaten eines neuen, modifizierten oder in anderer Weise unzureichend beschriebenen Verfahrens festzustellen. Sie sollte zu numerischen und beschreibenden Kenngrößen für die Leistungsfähigkeit führen und eine detaillierte und eindeutige Beschreibung des Nachweisziels beinhalten (positive Kolonie, Röhrchen oder Plaque).

Primäre Validierung wird typischerweise unter Anwendung von eigens entwickelten Versuchsschemata durchgeführt.

Ein Labor, das ein eigenes Verfahren oder eine Variation einer bestehenden Norm entwickelt, sollte die Schritte der primären Validierung durchführen.

Es ist unumgänglich, dass technische Angestellte, die an der primären Validierung beteiligt sind, fundierte Erfahrung mit anderen mikrobiologischen Verfahren aufweisen.

4.2.3 Sekundäre Validierung

Die sekundäre Validierung (auch Verifikation genannt) findet statt, wenn ein Labor beginnt, ein Verfahren anzuwenden, das woanders entwickelt wurde. Sekundäre Validierung konzentriert sich auf das Sammeln von Nachweisen, dass das Labor in der Lage ist, die in der primären Validierung festgelegten Kenngrößen einzuhalten. Im Moment sind für die meisten Verfahren keine Kenngrößen vorhanden. Ergebnisse der externen Qualitätssicherung (siehe 4.2.8) müssen daher eventuell als erster Schritt einer vollständigen sekundären Validierung herangezogen werden.

Üblicherweise benutzt die sekundäre Validierung ausgewählte und vereinfachte Formen derselben Verfahren, die in der primären Validierung verwendet wurden. Diese werden aber möglicherweise über einen längeren Zeitraum durchgeführt. Natürliche Proben sind das optimale Versuchsmaterial und bei den Untersuchungen braucht das Verfahren nur innerhalb der durch die primäre Validierung vorgegeben Arbeitsgrenzen untersucht zu werden.

4.2.4 Analytische Qualitätskontrolle (AQC)

Die Anwendung valider Verfahren innerhalb ihrer genau angegebenen, verlässlichen Grenzen stellt nicht automatisch valide Ergebnisse sicher. Eine analy-

tische Qualitätskontrolle (AQC), die zusammen mit den täglichen Routineuntersuchungen durchgeführt wird, ist notwendig. Sie kontrolliert die Befähigung zur erfolgreichen Anwendung eines Verfahrens.

AQC ist ein kontinuierlicher Prozess. Leitkarten, deren Grenzwerte sich aus Kenngrößen des Verfahrens (aus der primären Validierung) oder aus theoretischen Überlegungen ableiten, sind die grundlegenden Handwerkszeuge.

Die Verfahren der AQC sind Erweiterungen der routinemäßigen analytischen Verfahren, wie z. B. Wiederholungen auf unterschiedlichen Ebenen oder einfach auch Berechnungen, die regulär nicht an Routinedaten durchgeführt werden. Zusätzlich werden Referenzmaterialien, externe Qualitätssicherungsmaßnahmen und dotierte Proben verwendet.

Die analytische Qualitätskontrolle wird im Zusammenhang mit der primären und sekundären Validierung benötigt. Ausschließlich verlässliche Ergebnisse im Sinne der AQC sollten zur Ableitung der Validierungskriterien und Verfahrenskenndaten benutzt werden.

Internationale und nationale Arbeitsgruppen haben zahlreiche Dokumente zur analytischen Qualitätskontrolle mikrobiologischer Verfahren verfasst (z.B. Literaturhinweise [1, 2, 3, 4, 7, 8, 20, 21, 24, 26]). Methodenhandbücher verfügen ebenfalls über Kapitel zu diesem Thema. Obwohl die Verfahren der analytischen Qualitätskontrolle entscheidend für die Validierung sind, werden sie in dieser Europäischen Vornorm nicht im Detail besprochen. Bei den weiteren Ausführungen wird angenommen, dass die Laboratorien die geeigneten analytischen Kontrollen sowie interne und externe Qualitätssicherungsmaßnahmen durchführen.

4.2.5 Gleichwertige Verfahren

Es ist notwendig, zwei Verfahren parallel an denselben Proben anzuwenden, wenn ein laborspezifisches Verfahren entwickelt werden soll oder um Daten zu sammeln, die die Anwendung eines alternativen Verfahrens rechtfertigen sollen.

Die Verfahrenskenndaten setzen sich aus vielen Aspekten zusammen. Es gibt weder einen einzelnen Versuch noch numerische Kriterien zur Feststellung der Gleichwertigkeit von Verfahren. Ein Verfahren kann, was die Spezifität betrifft, besser sein, aber schlechter in der Wiederfindung. Alle gesammelten Informationen zur Robustheit, Präzision und Spezifität, die während der Validierungsprüfungen gewonnen wurden, können für Verfahrensvergleiche herangezogen werden (Beispiele B.2, B.3, B.4 in Anhang B). Die Verfahren müssen nur zum Vergleich der Wiederfindung parallel untersucht werden.

Ein Verfahren mit der höchsten Wiederfindung der bestätigten Zielorganismen ist offensichtlich das Beste, es sei denn, dass bei routinemäßiger Anwendung immer eine Bestätigung erforderlich ist. Ein Verfahren mit etwas niedrigerer Wiederfindung, die dafür aber keine Bestätigung benötigt, ist eventuell vorzuziehen. Falls eine in der primären Validierung beobachtete hohe Falsch-Negativ- oder Falsch-Positiv-Rate nicht durch verbesserte Definitionen der Zielkolonien korrigiert werden kann, sollte das Verfahren als nicht verwendungsfähig beurteilt werden.

4.2.6 Testmaterialien

Die allgemeine Vorstellung ist, dass die Validierung die Routine so gut wie möglich simulieren sollte. Natürliche Proben mit natürlichen Konzentrationen an Mikroorganismen sollten daher die bevorzugten Versuchsmaterialien sein. Unter bestimmten Umständen gibt es aber Ausnahmen.

Künstliche Proben (zertifizierte Referenzmaterialien und dotierte Proben) werden in internen und externen Qualitätssicherungsprogrammen verwendet, um die grundlegende Beherrschung des Verfahrens bei den an der Validierung teilnehmenden Laboratorien sicherzustellen.

Dotierung kann bei der sekundären Validierung sinnvoll und sogar notwendig sein, sobald es schwierig ist, natürliche Proben mit Zielorganismen zu finden. Dadurch wird es dem Laborpersonal ermöglicht, sich mit dem Zielorganismus vertraut zu machen.

Negative Proben (Blanks) sollten auf die interne Qualitätssicherung beschränkt bleiben. Ihre Einbeziehung bei Proben, die zum Zweck des Verfahrenvergleichs untersucht werden, kann zu dem falschen Eindruck führen, dass es eine gute Korrelation zwischen den Verfahren gibt. Wenn es möglich wäre im Voraus zu wissen, welche natürlichen Proben keine Zielorganismen enthalten, wären diese Proben eine geeignete Auswahl, um bei der eigentlichen Validierung Falsch-Positive zu testen.

Der optimale Konzentrationsbereich für die Validierung mikrobiologischer Verfahren ist enger als ihr geplanter Anwendungsbereich. Hohe Konzentrationen sind nicht notwendig. Sie ähneln Reinkulturen und stellen die Leistungsfähigkeit des Verfahrens oder des Labors nicht auf die Probe.

Proben mit sehr niedrigem Bakteriengehalt müssen aus Gründen der Volksgesundheit untersucht werden, sind aber für Verfahrensvergleiche und andere Validierungsverfahren aus statistischen Gründen ungeeignet. Dieses Problem ist insofern nicht kritisch, als mikrobiologische Verfahren im Allgemeinen am unteren Ende des Messbereichs nicht konzentrationsabhängig sind. Jeder individuelle Keim reagiert mit dem Nährmedium fast unabhängig von anderen Partikeln in der Probe. Wenn ein Verfahren im Vergleich mit einem anderen Verfahren eine niedrige Wiederfindung hat, wird dies bei 20 oder 30 koloniebildenden Partikeln je Platte deutlicher zum Ausdruck kommen als bei nur einem oder wenigen Partikeln je Platte.

Von Verfahren, die sich bei zur Validierung ausreichenden Konzentrationen als valide gezeigt haben, wird angenommen, dass sie bei niedrigen Untersuchungskonzentrationen ebenfalls funktionieren.

4.2.7 Proben — Repräsentativität und Hinlänglichkeit

Die Theorie der Statistik liefert Lösungen zur Berechnung der Probenanzahl, die für unterschiedliche Versuche oder Abschätzungen erforderlich sind [3, 13]. Um von der Theorie Gebrauch machen zu können, sollte die Größenordnung von tatsächlich wichtigen Einflüssen und die Wahrscheinlichkeit, mit der solche entdeckt werden sollen, definiert werden. Eine Abschätzung der Unsicherheit (Präzision) der Bestimmung sollte verfügbar sein und die Probenahme sollte zufällig erfolgen.

Es ist schwierig, viele oder alle der oben genannten Anforderungen bei der vorangehenden Planung und bei der Ausführung der Leistungsprüfung von mikrobiologischen Verfahren zu erfüllen. Statistische Techniken, falls überhaupt verwendet, werden zu groben Anleitungen.

Die Anzahl und Vielfalt von untersuchten Proben sollte ausreichend sein, um zu überzeugen. Es gibt keine exakten Verfahren, dies zu entscheiden, ohne die Statistik zu Hilfe zu nehmen. In einigen Fällen mag die erste untersuchte Probe das Ergebnis bringen, dass das Verfahren nicht gut genug ist. Üblicherweise werden aber mehr Proben benötigt. Es kann tausend Proben erfordern, um zu „beweisen“, dass zwei P/A-Verfahrensweisen nicht gleichwertig sind. Die Auswahl zu weniger Proben kann Zeitverschwendung sein.

4.2.8 Externe Qualitätssicherung und andere Ringversuche

Die Teilnahme verschiedener Laboratorien bei Untersuchungen von „homogenem“ Material gilt als unerlässlich, um sowohl die Leistungsfähigkeit des Verfahrens als auch des Labors zu prüfen. (Nachdem Ausreißer erkannt und entfernt wurden, wird davon ausgegangen, dass die verbleibenden Daten die notwendige Information über Leistungsfähigkeit und Eignung des Verfahrens liefern.)

Ringversuche haben sich zu einem weit verbreiteten Werkzeug zur Untersuchung von Präzisionsmerkmalen chemischer Verfahren entwickelt [34]. Es scheint ein wenig verfrüht zu sein, dasselbe uneingeschränkt für die Mikrobiologie zu empfehlen. Es wird vorausgesetzt, dass alle teilnehmenden Laboratorien mehrjährige Erfahrung mit den geprüften Verfahren und die nachgewiesene Befähigung haben, diese durchzuführen. Die heutige Erfahrung zeigt, dass Ringversuche, die als Leistungsprüfung für Verfahren gedacht sind, oft zu Leistungsfähigkeitstests für die Laboratorien oder zu Trainingsübungen werden.

Zahlreiche mikrobiologische Verfahren sind seit Jahrzehnten in Hunderten von Laboratorien in Gebrauch (z. B. Endo-Agar für Gesamt-Coliforme, mFC für thermotolerante Coliforme, m-Enterokokken-Agar für intestinale Enterokokken). Theoretisch wären diese Verfahren deshalb geeignete Objekte für Ringversuche zur Prüfung ihrer Leistungsfähigkeit.

Wenn Ringversuche zur Eignung von Verfahren für spezifische Zielorganismen mit Selektivmedien durchgeführt werden, sollten die Proben fast zwangsläufig mit Rein- oder Mischkulturen versetzt werden. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von zertifizierten Referenzmaterialien. Dies ist eine vereinfachte und künstliche Situation. Es werden dabei eventuell große Probleme übersehen, die andere Laboratorien während des routinemäßigen Gebrauchs von Verfahren mit natürlichen Proben erfahren. Solange keine genauen quantitativen Verfahrenskenndaten vorliegen, stellen diese externen Qualitätssicherungsmaßnahmen (EQS) trotzdem die zufrieden stellendste Möglichkeit einer sekundären Validierung (Verifizierung) dar.

4.3 Nachweissysteme

4.3.1 Allgemeines

Oftmals ist es vorteilhaft, ein Nährmedium in seinem Behälter als Nachweissystem anzusprechen. Zwei Arten von Nachweissystemen, fest und flüssig,

werden in verschiedenen Varianten mikrobiologischer Verfahren eingesetzt. Sie sind ferner meist mit unterschiedlichen Prinzipien für die Zählung oder den Nachweis assoziiert: flüssig mit P/A und MPN und fest mit Koloniezählungen.

Jede Art der Validierung in der Mikrobiologie konzentriert sich auf die Leistungsfähigkeit der Nachweissysteme.

Die Röhrchenreihen (MPN) oder die Reihen von (zählbaren) Platten, die für die Analyse genutzt werden, werden als Nachweisreihe oder Nachweissystemreihe bezeichnet. Jedes einzelne MPN-Röhrchen ist ein P/A-Nachweissystem.

BEISPIEL Eine einzelne Vertiefung einer Mikrotiterplatte ist ein P/A-Nachweissystem. Die gesamte Platte ist, wenn sie als MPN-System genutzt wird, eine Nachweisreihe.

4.3.2 Vergleiche der Nachweissysteme

Für die meisten Koloniezählverfahren kann ein flüssiges Duplikat mit derselben chemischen Zusammensetzung, aber ohne die feste Matrix (Agar, Membranfilter) hergestellt werden. Der Einfluss der festen Umgebung kann durch den Vergleich der Koloniezahl mit der gleichwertigen MPN-Abschätzung bestimmt werden, vorausgesetzt, dass das Verhalten zur Erkennung des Zielorganismus bei beiden Nachweissystemtypen identisch ist und die Anzahl der parallelen Röhrchen groß genug ist für eine ausreichende Präzision. Auch die Empfindlichkeit der P/A-Nachweissysteme kann durch ähnliche Flüssig-Fest-Vergleiche bestimmt werden.

4.4 Verfahrenskennndaten

Verfahrenskennndaten sollten quantifizierbar und nachprüfbar sein, um in der Validierung von Nutzen zu sein.

Die Terminologie der Verfahrenskennndaten in dieser Europäischen Vornorm folgt hauptsächlich dem Gebrauch in der Chemometrologie. Da die ursprünglichen Definitionen der Ausdrücke nicht immer genau für die mikrobiologischen Verfahren anwendbar sind, wurden sie, soweit notwendig, modifiziert und angeglichen.

Die in dieser Europäischen Vornorm behandelten Verfahrenskennndaten beziehen sich auf den Anwendungsbereich (Aufzählung der Bedingungen und Proben typen, für die das Verfahren anwendbar ist), die Präzision, Linearität, Wiederfindung, Arbeitsgrenzen für die niedrigste und höchste empfohlene Koloniezahl je Platte, Selektivität, Spezifität und die Robustheit. Definitionen für diese und weitere Begriffe sind im Abschnitt 2 aufgeführt.

4.5 Kenngrößen

Kenngrößen sind entweder numerische oder qualitative Ausdrücke der Verfahrenskennndaten oder Arbeitsgrenzen, die von ihnen abgeleitet werden. Die primäre Validierung sollte das Folgende liefern:

- a) morphologische Identifizierung des (verdächtigen) Zielorganismus;
- b) Aussagen zu Inkubationsbedingungen (Temperatur, Zeit, Gasatmosphäre, Feuchtigkeitsgehalt) und Mediencharakteristika (pH, Stabilität);