

DIN 38411-25



ICS 07.100.20

Einsprüche bis 2024-10-21

Entwurf

**Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und
Schlammuntersuchung –
Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K) –
Teil 25: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen
Bestätigungsverfahren und für Verifizierungen von validierten
alternativen Bestätigungsverfahren (K 25)**

German standard methods for the examination of water, waste water and sludge –
Microbiological methods (group K) –
Part 25: Protocol for the validation of alternative confirmation procedures and for
verifications of validated alternative confirmation procedures (K 25)

Méthodes normalisées allemandes pour l'analyse des eaux, des eaux résiduaires et des
boues –

Méthodes microbiologiques (groupe K) –

Partie 25: Protocole pour la validation des procédures de confirmation alternatives et pour la
vérification des procédures de confirmation alternatives validées (K 25)

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-06-21 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme
vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses
Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-
Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de,
sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an naw@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann
im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-
Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz,
Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind,
mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 41 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Bezeichnung	11
5 Allgemeine Prinzipien für die Validierung von Bestätigungsverfahren	11
6 Stämme	12
7 Verfahrenvergleichsuntersuchung	12
7.1 Allgemeines	12
7.2 Auswahl der Prüforganismen	12
7.3 Untersuchung zum Maß der Inklusivität	13
7.3.1 Prüfung der Zielstämme	13
7.3.2 Familien-Ebene	13
7.3.3 Gattungs-Ebene	13
7.3.4 Spezies-Ebene	13
7.3.5 Typisierung unterhalb der Spezies-Ebene	14
7.4 Untersuchung zum Maß der Exklusivität	14
7.4.1 Prüfung von Nicht-Zielstämmen	14
7.4.2 Familien-Ebene	14
7.4.3 Gattungs-Ebene	14
7.4.4 Spezies-Ebene	15
7.4.5 Typisierung unterhalb der Spezies-Ebene	15
7.5 Angabe und Auswertung der Ergebnisse	15
7.5.1 Angabe und Auswertung der Ergebnisse zur Inklusivität	15
7.5.2 Angabe und Auswertung der Ergebnisse zur Exklusivität	16
7.6 Gesamtbewertung	18
7.7 Anforderungen an den Validierungsbericht	19
8 Laborübergreifende Vergleichsstudie	20
8.1 Allgemeines	20
8.2 Erforderliche Datensätze	20
8.3 Arbeitsvorschrift	21
8.4 Darlegung der Ergebnisse	21
8.5 Auswertung und Bewertung	22
9 Validierte alternative Bestätigungs- und Typisierungsverfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Verifizierung	23
9.1 Allgemeines	23
9.2 Untersuchungsdesign	23
9.2.1 Allgemeines	23
9.2.2 Auswahl der Stämme	24
9.3 Beurteilung der Ergebnisse	24
9.4 Zulässigkeitsgrenze	24
9.5 Ursachenanalyse	24
Anhang A (normativ) Bei der Auswahl von Stämmen für die Untersuchung zur Inklusivität und Exklusivität zu berücksichtigende Aspekte	26
A.1 Allgemeines	26
A.2 Kategorien von Zielgruppen	26
A.3 Auswahl der Zielgruppe für eine Untersuchung zur Inklusivität	26
A.4 Auswahl der Nicht-Zielgruppen für eine Untersuchung zur Exklusivität	26
Anhang B (normativ) Übersicht über die Mindestanzahl der zu prüfenden Stämme sowie die Zulässigkeitsgrenzen	28

Anhang C (informativ) Validierung der Identifizierung von Mikroorganismen mit spektrometrischen oder spektroskopischen Methoden im Einzellabor oder im Laborverbund	30
C.1 Validierung der Identifizierung von Mikroorganismen mit spektrometrischen oder spektroskopischen Methoden im Einzellabor oder im Laborverbund	30
C.2 Beispiel für empfohlene minimale Stichprobengrößen von Ziel-Parameter und Nicht-Ziel-Parameter zur Ermittlung von zu erreichenden Leistungskennzahlen für spektroskopische oder spektrometrische Anwendungen	31
C.3 Daten aus einer Validierung eines Einzellabors am Beispiel von <i>Clostridium perfringens</i>	33
Anhang D (informativ) Validierung von <i>Legionellaceae</i> als Beispiel für eine Validierung auf Familien-Ebene	35
Anhang E (informativ) Validierung <i>Pseudomonas aeruginosa</i> als Beispiel für eine Validierung auf Spezies-Ebene	36
Anhang F (informativ) Validierung <i>Clostridium perfringens</i> als Beispiel für eine Validierung auf Spezies-Ebene	37
Anhang G (informativ) Validierung von intestinalen <i>Enterococcus spp.</i> als Beispiel für eine Validierung auf Gattungsebene einer nicht-taxonomischen Gruppe	38
Anhang H (informativ) Validierung <i>Coliformen Bakterien</i> als Beispiel für eine Validierung einer nicht-taxonomischen Gruppe	39
Anhang I (informativ) Beispiele zur Verifizierung eines alternativen Bestätigungsverfahrens	40
Literaturhinweise	41

Tabellen

Tabelle 1 — Beispiel zur Darstellung der Ergebnisse für die Inklusivität	15
Tabelle 2 — Auswertung der Ergebnisse des Referenz- und des Alternativverfahrens für die Untersuchung zum Maß der Inklusivität	16
Tabelle 3 — Beispiel zur Darstellung der Ergebnisse für die Exklusivität	17
Tabelle 4 — Auswertung der Ergebnisse des Referenz- und des Alternativverfahrens für die Untersuchung zum Maß der Exklusivität	17
Tabelle 5 — Beispiel Zusammenfassung der Ergebnisse in der Verfahrensvergleichsuntersuchung	18
Tabelle 6 — Beispiel zur Bewertung der Ergebnisse aus der Verfahrensvergleichsuntersuchung	19
Tabelle 7 — Darstellung der Ergebnisse der laborübergreifenden Vergleichsstudie	22
Tabelle 8 — Zusammenfassung der Ergebnisse der laborübergreifenden Vergleichsstudie	22
Tabelle 9 — Bewertung der Ergebnisse aus der laborübergreifenden Vergleichsstudie	22
Tabelle 10 — Anzahl der Stämme zur Verifizierung der Implementierung von validierten alternativen Bestätigungs- oder Typisierungsverfahren	23
Tabelle 11 — Übersicht der Verifizierungsergebnisse für ein validiertes alternatives Bestätigungs- oder Typisierungsverfahren	24
Tabelle B.1 — Mindestanzahl der zu prüfenden Stämme sowie die Zulässigkeitsgrenzen für die Verfahrensvergleichsuntersuchung	28
Tabelle B.2 — Anzahl der erforderlichen Ergebnisse sowie die Zulässigkeitsgrenzen für die laborübergreifende Vergleichsstudie	29
Tabelle C.1 — Leistungsparameter und Stichprobengrößen	31
Tabelle C.2 — Beispiel für die Verfahrensbeschreibung in einem tabellarischen Validierungsbericht zur Identifizierung von <i>Clostridium perfringens</i>	33
Tabelle C.3 — Beispiel für die Auswertung in einem tabellarischen Validierungsbericht zur Identifizierung von <i>Clostridium perfringens</i>	34

Vorwort

Dieses Dokument wurde vom Arbeitskreis NA 119-01-03-03-03 AK „Alternative Bestätigungsreaktionen in der Mikrobiologie“ des Arbeitsausschusses „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) erarbeitet.

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

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

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasser-chemischen Gesellschaft – Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) – gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung:

Arbeitsvorschrift für die Validierung von Alternativen Bestätigungsverfahren und für Verifizierungen von validierten alternativen Bestätigungsverfahren (K 25).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der DIN Media GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlamm-Untersuchung“ gemeinsam von der DIN Media GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

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

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

WARNUNG — Anwender dieses Dokuments sollten mit der üblichen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument gibt nicht vor, alle unter Umständen mit der Anwendung des Verfahrens verbundenen Sicherheitsaspekte anzusprechen. Es liegt in der Verantwortung des Arbeitgebers, angemessene Sicherheits- und Schutzmaßnahmen zu treffen und sicherzustellen.

Einleitung

Die mikrobiologische Untersuchung von Wasser erfolgt derzeit nach in Verordnungen angegebenen Verfahren, die je nach Verfahren eine Bestätigung erfordern.

Das Dokument wurde erstellt, um für die Wasseranalyse die Verwendung alternativer moderner Technologien und Methoden zur bestätigenden Identifizierung zu ermöglichen. Nach dieser Norm validierte alternative Methoden können als Bestätigungsverfahren auch im Rahmen bestehender Referenzverfahren eingesetzt werden und die bestehenden Kulturverfahren bei Bedarf teilweise oder ganz substituieren.

Technische Weiterentwicklungen ermöglichen die schnelle, einfache und genaue Identifizierung von Mikroorganismen. Diese beispielsweise in der Medizin und in der Lebensmittelanalytik bereits etablierten Methoden geben den Stand der Technik wieder. Ihre Anwendung ist auch in der Wasseruntersuchung wünschenswert. Beispiele solcher Technologien mit breiter Anwendung sind unter anderem die matrixunterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) oder schwingungsspektroskopische Methoden (Infrarotspektroskopie, Raman-Spektroskopie), siehe Anhang C.

Zur Bewertung der durch mikrobielle Kontaminationen bedingten Risiken für die menschliche Gesundheit, für die verbesserte Ursachenaufklärung bei Ausbruchsgeschehen oder für die Ermittlung von Kontaminationspfaden kann oft eine schnelle Identifizierung mindestens bis auf die Spezies-Ebene erforderlich sein, siehe Anhang C.

Zur Sicherstellung des vorbeugenden Gesundheitsschutzes ist die Einhaltung eines hohen Qualitätsstandards bei der Wasseranalytik eine wichtige Voraussetzung, die sich durch die Anwendung moderner Methoden und deren anerkannte, transparente Validierung und Verifizierung erreichen lässt.

In diesem Dokument werden verschiedene Möglichkeiten zur Validierung oder Verifizierung von Prüfverfahren bereitgestellt, die auf einem einheitlichen Vorgehen beruhen. Berücksichtigung finden sowohl, die Situation eines Einzellabors, sowie die eines Laborverbundes.

In diesem Dokument werden dazu Leistungskriterien für Validierungen alternativer Methoden im Kontext bestehender verwandter Regelungen auf internationaler Ebene (u. a. Normenreihe DIN EN ISO 16140) festgelegt. Zudem wurden aktuelle geeignete methodenspezifische nationale Leitlinien zur Validierung [2] berücksichtigt. Die hier beschriebene Vorgehensweise in zwei Stufen erlaubt den Nachweis der Gebrauchstauglichkeit alternativer Bestätigungsverfahren für den Anwendungsbereich Wasser.

- Die erste Stufe umfasst entweder die Validierung des Verfahrens mit mehreren Laboren, gefolgt von einer laborübergreifenden Vergleichsstudie oder die Validierung des Verfahrens innerhalb eines Einzel-Labors bzw. Laborverbundes ohne laborübergreifende Vergleichsstudie.
- Die zweite Stufe besteht aus der Verifizierung des Verfahrens. Hier wird von einem Labor gezeigt, dass es das bereits validierte Verfahren zufriedenstellend durchführen kann.

1 Anwendungsbereich

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

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

- Trink-, Grund-, Oberflächen- und Abwasser;
- Nutz-, Prozess- und Brauchwasser;
- sonstige Wässer;
- Schlämme.

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

Dies beinhaltet auch, dass das alternative Bestätigungsverfahren

- im Referenzverfahren,
- in einem Alternativverfahren, dass validiert worden ist, sofern dabei eines der in der Validierungsuntersuchung des alternativen Bestätigungsverfahrens angegebenen Isolierungs-Agars verwendet wird

bei erfolgreicher Validierung nach diesem Dokument ersetzt werden kann.

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

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

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

Des Weiteren legt dieses Dokument die Arbeitsvorschrift fest, die bei der Verifizierung von validierten alternativen Verfahren zur Umsetzung im Anwenderlabor eingesetzt werden.

Dieses Dokument ist auf die Verifizierung von alternativen Verfahren im Rahmen dieses Dokuments anwendbar.

Die technischen Arbeitsvorschriften für die Verifizierung validierter qualitativer Verfahren und validierter quantitativer Verfahren sind im Abschnitt 9 beschrieben.

2 Normative Verweisungen

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

DIN EN ISO 11133:2020-10, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien (ISO 11133:2014, korrigierte Fassung 2014-11-01 + Amd. 1:2018 + Amd. 2:2020); Deutsche Fassung EN ISO 11133:2014 + A1:2018 + A2:2020*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

DIN und DKE stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- DIN-TERMinologieportal: verfügbar unter <https://www.din.de/go/din-term/>
- DKE-IEV: verfügbar unter <https://www.dke.de/DKE-IEV>

3.1

Laborverbund

Zusammenschluss von Laboren, mehrere Standorte, definierte Arbeitsgemeinschaft mit gleicher Zielsetzung (z. B. verschiedene Wasserlabore mit Ziel einer Methodenvalidierung)

3.2

Kultur- oder Sammlungsnummer

ist eine stamm-/isolatspezifische Kennzeichnungsnummer zur eindeutigen Identifizierung

BEISPIEL 1 Nummer aus einer Referenzstammsammlung (z. B. WDCM (bevorzugt) ansonsten, ATCC, DSMZ, usw.)

BEISPIEL 2 Laborspezifische bzw. laborinterne Nummer, um Isolate zu identifizieren.

3.3

Zulässigkeitsgrenze

AL, en: acceptance limits

zulässige höchste positive oder negative Differenz zwischen dem alternativen Bestätigungsverfahren und dem Referenzbestätigungsverfahren einer Probe und einem einzelnen Ergebnis, das bei der Ausführung der Arbeitsanweisung eines Untersuchungsverfahrens erhalten wurde

3.4

alternatives Bestätigungsverfahren

zur Validierung vorgelegtes Bestätigungs- oder Typisierungsverfahren

Analyseverfahren, mit dem derselbe Analyt bestätigt oder typisiert wird wie mit dem entsprechenden Referenzverfahren

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Verfahren kann urheberrechtlich geschützt sein. Die Verwendung des Begriffs „alternativ“ bezieht sich auf das gesamte „System von Prüfverfahren und Reaktion“. Der Begriff schließt alle materiellen oder sonstigen Bestandteile ein, die zur Durchführung des Verfahrens erforderlich sind.

[QUELLE: DIN EN ISO 16140-6:2020-04, 3.2, modifiziert — Anmerkung 2 zum Begriff gestrichen.]

3.5

Bestätigungsprüfung

Einzelprüfung, die zur Bestätigung eines vorläufigen Ergebnisses durchgeführt wird

3.6

Bestätigungsverfahren

Reihe von festgelegten *Bestätigungsprüfungen* (3.5), die bei einem Stamm durchgeführt werden und deren zusammengefasste Ergebnisse zur endgültigen Bestätigung der Identität dieses Stamms verwendet werden

3.7

Exklusivität

Untersuchung zur Ausschlusssicherheit

Untersuchung unter Verwendung reiner *Nicht-Zielstämme* (3.19), die möglicherweise zu einem falsch positiven Ergebnis führen können

3.8

falsch negatives Untersuchungsergebnis

FN, en: false negative

negatives Ergebnis des alternativen Verfahrens, das im Referenzverfahren positiv ist

3.9

falsch positives Untersuchungsergebnis

FP, en: false positive

positives Ergebnis des alternativen Verfahrens, das im Referenzverfahren negativ ist

3.10

negative Abweichung

ND, en: negative deviation

ein (durch eine ergänzende Identifizierung bestätigtes) negatives Ergebnis des *alternativen Verfahrens* (3.4), während das entsprechende Ergebnis des Referenzverfahrens positiv ist

3.11

positive Übereinstimmung

PA, en: positive agreement

sowohl das *alternative Verfahren* (3.4) als auch das Referenzverfahren führen zu einem positiven Ergebnis

3.12

positive Abweichung

PD, en: positive deviation

(durch eine ergänzende Identifizierung bestätigtes) positives Ergebnis des *alternativen Verfahrens* (3.4), während das entsprechende Ergebnis des Referenzverfahrens negativ ist

3.13

Negative Übereinstimmung

NA, en: negative agreement

sowohl das *alternative Verfahren* (3.4) als auch das Referenzverfahren führen zu einem negativen Ergebnis

3.14

Inklusivität

Untersuchung zum Maß der spezifischen Erfassung

Untersuchung unter Verwendung reiner *Zielstämme* (3.20), bei deren Anwendung im *alternativen Verfahren* (3.4) eine Bestätigung erwartet wird.

3.15

Exklusivität

Untersuchung zur Ausschlusssicherheit

Untersuchung unter Verwendung reiner *Nicht-Zielstämme* (3.19), bei deren Anwendung im *alternativen Verfahren* (3.4) keine Bestätigung erwartet wird.

3.16

laborübergreifende Vergleichsstudie

laborübergreifender Verfahrensvergleich, der Labore einbezieht, die vergleichende Messungen von mehreren *Isolaten* (3.22) oder *Referenzstämmen* (3.21) mit den zu vergleichenden Bestätigungsverfahren durchführen.

3.17

Verfahrensvergleichsuntersuchung

durch das organisierende Labor durchgeführte Untersuchung zum Vergleich des *alternativen Verfahrens* (3.4) mit dem Referenzverfahren

3.18

mikrobieller (Unter-)Typ

Gruppe von (innerhalb einer Spezies) eng miteinander zusammenhängenden Mikroorganismen, die sich nach der Bestimmung z. B. durch eine serologische Prüfung (Serotyp) oder eine molekulare Prüfung (Genotyp) durch ihre gemeinsamen spezifischen Merkmale unterscheiden

3.19

Nicht-Zielstamm

Stamm, der in Übereinstimmung mit dem Anwendungsbereich des Referenzverfahrens festgelegt ist, von dem nach vernünftigem Ermessen nicht erwartet wird, dass er bei Anwendung des alternativen Verfahrens (3.4) bestätigt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieser kann ein Referenzstamm oder ein Isolat sein.

3.20

Zielstamm

Stamm, der in Übereinstimmung mit dem Anwendungsbereich des Referenzverfahrens festgelegt ist, von dem erwartet wird, dass er bei Anwendung des alternativen Verfahrens bestätigt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Dies kann ein Referenzstamm oder ein Isolat sein.

[QUELLE: DIN EN ISO 16140-1:2016-11, 2.74, modifiziert — In der Definition wurde „nachgewiesen oder gezählt“ durch „bestätigt“ ersetzt.]

3.21

Referenzstamm

Mikroorganismus, der direkt von einer Referenzkultursammlung erhalten wird, d. h. einer Kultursammlung, die Mitglied des Weltverbandes für Kultursammlungen (en: World Federation of Culture Collections, WFCC) oder der Europäischen Organisation für Kultursammlungen (en: European Culture Collections Organisation, ECCO) ist, und mindestens bis zur Ebene der Gattung und Art definiert und nach seinen Merkmalen beschrieben und katalogisiert ist, wobei er vorzugsweise aus Lebensmitteln, Futtermitteln, Umgebungsproben aus der Lebens- oder Futtermittelproduktion oder Wasser, je nach Zutreffen, stammen sollte

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieser kann als Zielstamm oder Nicht-Zielstamm eingesetzt werden.

[QUELLE: DIN EN ISO 11133:2020-10, 3.4.2, modifiziert — Anmerkung 1 zum Begriff ergänzt]

3.22

Isolat

aus einer Probe gewonnener und ausreichend charakterisierter Wildtyp

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieses kann als Zielstamm oder Nicht-Zielstamm eingesetzt werden.

3.23

Inklusivitätsübereinstimmung

IA, en: inclusivity agreement

alternatives und Referenzbestätigungsverfahren liefern das gleiche Ergebnis bzw. *positive Abweichung* (PD) (3.12)

3.24

Inklusivitätsabweichung

ID, en: inclusivity deviation

falsch negatives Untersuchungsergebnis (3.8) bei der Inklusivitätsprüfung

3.25

Exklusivitätsübereinstimmung

EA, en: exclusivity agreement

alternatives und Referenzbestätigungsverfahren liefern das gleiche Ergebnis bzw. *Negativabweichung* (ND) (3.10)

3.26

Exklusivitätsabweichung

ED, en: exclusivity deviation

falsch positives Untersuchungsergebnis (FP) (3.9) bei der Exklusivitätsprüfung

3.27

Referenzbestätigungsverfahren

Bestätigungsprüfung oder Kombination von Bestätigungsprüfungen, wie im Referenzverfahren beschrieben, die durch das *alternative Bestätigungsverfahren* (3.4) ersetzt werden sollen

3.28

Referenzverfahren

qualitative oder quantitative Methode einschließlich Bestätigungsverfahren

4 Bezeichnung

Bezeichnung des Verfahrens für die Validierung von alternativen Bestätigungsverfahren und für Verifizierungen von validierten alternativen Bestätigungsverfahren (K 25):

Verfahren DIN 38411 — K 25

5 Allgemeine Prinzipien für die Validierung von Bestätigungsverfahren

In der Validierungsuntersuchung wird das alternative Bestätigungsverfahren mit dem Bestätigungsverfahren verglichen, das im Referenzverfahren für die Auszählung oder den Nachweis bestimmter (Gruppen von) Mikroorganismen beschrieben ist.

Die Arbeitsvorschrift für die Validierung umfasst die folgenden Phasen:

- eine Verfahrensvergleichsuntersuchung des alternativen Bestätigungsverfahrens gegenüber dem Referenzbestätigungsverfahren, die im organisierenden Labor durchgeführt wird;
- eine laborübergreifende Vergleichsstudie (nicht erforderlich bei Validierung im Einzellabor);
- eine Verifizierung des validierten alternativen Bestätigungsverfahrens im Anwenderlabor.

Die Arbeitsvorschrift für die Validierung muss die selektiven Nährmedien/das selektive Nährmedium eindeutig angeben, deren/dessen Stämme mithilfe des alternativen Bestätigungsverfahrens bestätigt werden können. Alle Inklusivitäts- und Exklusivitätsstämme müssen geprüft werden. In Fällen, in denen bestimmte Stämme nicht auf dem festgelegten selektiven Nährmedium/den festgelegten selektiven Nährmedien wachsen können, muss auch eine nicht selektive Nährmediumplatte in die Verfahrensvergleichsuntersuchung und die laborübergreifende Vergleichsstudie aufgenommen werden.

Die technischen Regeln für die Durchführung der Verfahrensvergleichsuntersuchung und der laborübergreifenden Vergleichsstudie sind in Abschnitt 7 und Abschnitt 8 angegeben. Die folgenden Fälle sind abgedeckt.

- Validierung von Verfahren zur Bestätigung auf Familien-Ebene;
- Validierung von Verfahren zur Bestätigung auf Gattungs-Ebene;
- Validierung von Verfahren zur Bestätigung auf Spezies-Ebene;
- Validierung von Verfahren zur Typisierung von z. B. *Legionella* spp. bis zur Serotyp-Ebene.

6 Stämme

Die Stämme für die Bestimmung der Inklusivität und der Exklusivität müssen eindeutig charakterisiert sein, wobei der Zweck der Validierungsuntersuchung zu beachten ist. Die Identifizierungsdaten der einzelnen Stämme werden zur (zusätzlichen) Bestätigung des Ergebnisses in den Fällen verwendet, in denen Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen des Referenzbestätigungsverfahrens und des alternativen Bestätigungsverfahrens auftreten.

ANMERKUNG Im Rahmen solcher Untersuchungen besteht die Möglichkeit, nationale, regionale oder internationale Referenzlabore hinzuzuziehen.

7 Verfahrensvergleichsuntersuchung

7.1 Allgemeines

Die Verfahrensvergleichsuntersuchung ist der Teil des Validierungsprozesses, der in einem einzelnen Labor oder in einem Laborverbund durchgeführt wird. Sie umfasst eine Untersuchung zum Maß der Inklusivität und Exklusivität des alternativen Verfahrens. Die Ergebnisse werden mit denen des Referenzbestätigungsverfahrens verglichen.

Das Referenzverfahren ist für den Methodenvergleich entscheidend und definiert die Tiefe der Validierung. Wird im Referenzverfahren die Spezies nachgewiesen, so muss für den Vergleich auf Speziesebene analysiert werden. Dabei ist zu berücksichtigen welche Zielorganismen vom Referenzverfahren in der Realität erfasst werden. Die Benennung der Isolate/Materialien sollte sich hierbei nach dem aktuell anerkannten Stand der Taxonomie richten. Dies kann im Einzelfall zu vermeintlichen Konflikten der Benennung führen, wenn das bisherige – in Normen festgelegte – Verfahren die Weiterentwicklung in der Taxonomie bisher nicht berücksichtigt, oder wenn im bisherigen Verfahren andere taxonomische Spezies miterfasst werden. Durch eine der Validierung/Verifizierung vorangestellte Bewertung des taxonomischen Standes kann dieser Umstand in der Validierung/Verifizierung Berücksichtigung finden.

BEISPIEL 1 Im Referenzverfahren wird *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen, so muss nach dem Schema Spezies validiert werden, siehe Anhang E.

BEISPIEL 2 Im Referenzverfahren werden laut Titel *Legionella* spp. nachgewiesen. Die Methode erfasst aber tatsächlich die Familie *Legionellaceae*, so ist die Prüfung auf Familien-Ebene durchzuführen, siehe Anhang D.

7.2 Auswahl der Prüforganismen

Die Auswahl der Prüfstämme sollte die vorgesehene Anwendung repräsentieren. Die Kriterien für die Auswahl von Prüfstämmen sind in Anhang A angegeben. Bei der Auswahl der Stämme sollte das Messprinzip (z. B. kulturbasiert, immunologisch, proteinbasiert, molekularbasiert) des Alternativverfahrens berücksichtigt werden. Verschiedene Messprinzipien können die Verwendung verschiedener Listen mit Stämmen erfordern, die die Vielfalt der untersuchten Mikroorganismen/des untersuchten Mikroorganismus widerspiegeln. Es ist wichtig, Nicht-Zielmikroorganismen einzubeziehen, die unter Umständen auf den für das Referenzverfahren und das Alternativverfahren verwendeten Medien wachsen. Dazu gehören auch solche, die verdächtige Kolonien (d. h. Kolonien mit einem ähnlichen Erscheinungsbild wie die von den Zielstämmen gebildeten) bilden.

Die Auswahl der Stämme und ihrer Merkmale bzw. Charakteristika müssen im Bericht zur Validierungsuntersuchung begründet und aufgezeichnet werden.

Jeder Stamm muss auf der geforderten Validierungsebene ausreichend detailliert (beispielsweise biochemisch und/oder serologisch und/oder genetisch) charakterisiert sein, damit seine Identität bekannt ist. Die Stämme sollten unter Berücksichtigung des Anwendungsbereichs der Validierung vorzugsweise aus Wasser- und Umweltproben, der Umgebung bei der Lebensmittelherstellung oder dem Bereich der Primärproduktion isoliert worden sein. Es können jedoch auch klinische Stämme, Lebensmittelstämme und Stämme aus Kultursammlungen verwendet werden. Die ursprüngliche Quelle aller Stämme sollte bekannt sein, und sie sollten in einer örtlichen (z. B. in einem Expertenlabor), nationalen oder internationalen Kultursammlung aufbewahrt werden, damit sie bei Bedarf in zukünftigen Untersuchungen verwendet werden können. Hinweise zur örtlichen Instandhaltung von Stammkulturen können DIN EN ISO 11133:2020-10 entnommen werden.

Die Verwendung von Ergebnissen, die mithilfe des Referenzverfahrens von einem spezialisierten Bezugslabor ermittelt wurden, ist dann möglich, wenn das die Validierungsuntersuchung durchführende Labor die Bestätigung/Typisierung seltener Stämme nach dem Referenzverfahren nicht durchführen kann. So ist es beispielsweise zulässig, bei der Untersuchung seltener *Legionella*-Serotypen die Serotypisierungsergebnisse eines *Legionella*-Bezugslabors zu verwenden.

7.3 Untersuchung zum Maß der Inklusivität

7.3.1 Prüfung der Zielstämme

Von allen Zielstämmen müssen Kulturen sowohl mit dem Referenzbestätigungsverfahren als auch mit dem alternativen Bestätigungsverfahren geprüft werden. Es ist nicht erforderlich, das Referenzbestätigungsverfahren gemeinsam mit dem alternativen Bestätigungsverfahren zu wiederholen, wenn die erforderlichen Daten für das Referenzverfahren vorliegen. Da alle Inklusivitätsstämme geprüft werden müssen, werden Subkulturen der Stämme auf einem nicht selektiven Nährmedium angelegt. Diese dienen als Ergänzung zu den eindeutig definierten selektiven Nährmedien / dem eindeutig definierten Nährmedium, auf denen/dem Stämme mithilfe des alternativen Bestätigungsverfahrens bestätigt werden können. So wird sichergestellt, dass ein lebensfähiger Stamm für die Bestätigung zur Verfügung steht.

Die Anzahl der unter verschiedenen, alternativen Optionen zu prüfenden Stämme (siehe 7.3.2 bis 7.3.5) ist in den Tabelle B.1 und Tabelle B.2 zusammengefasst.

In Fällen, in denen die Anzahl von vorgegebene Zielstämmen (siehe unten) nicht zur Verfügung steht, könnte unter Berücksichtigung von Faktoren wie der Häufigkeit des Auftretens und der Bedeutung für die öffentliche Gesundheit der Stämme neu überdacht werden. Es sollten mindestens 5 Stämme je mikrobiellem (Unter-)Typ vorliegen.

7.3.2 Familien-Ebene

Zur Bestätigung der Inklusivität müssen mindestens 200 unterschiedliche Zielstämme geprüft werden.

BEISPIEL Das Alternativverfahren beansprucht *Legionellaceae* nach DIN EN ISO 11731 [3] zu bestätigen. Mindestens 200 unterschiedliche Stämme/Isolate von *Legionellaceae* wie *Legionella spp.*, *Fluoribacter spp.* und *Tatlockia spp.* werden in die Untersuchung zum Maß der Inklusivität einbezogen.

7.3.3 Gattungs-Ebene

Zur Bestätigung der Inklusivität müssen mindestens 150 unterschiedliche Zielstämme geprüft werden.

BEISPIEL Das Alternativverfahren beansprucht intestinaler *Enterococcus spp.* nach DIN EN ISO 7899-2 [4] zu bestätigen. Mindestens 150 unterschiedliche Stämme von *Enterococcus spp.* wie *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* und *E. hirae* werden mindestens in die Untersuchung zum Maß der Inklusivität einbezogen.

7.3.4 Spezies-Ebene

Zur Bestätigung der Inklusivität müssen mindestens 100 unterschiedliche Zielstämme je Spezies geprüft werden.