

DIN EN ISO 16140-2

ICS 07.100.30

Entwurf

Einsprüche bis 2013-03-28
Vorgesehen mit
E DIN EN ISO 16140-1:2013-01
als Ersatz für
DIN EN ISO 16140:2011-12

**Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln –
Verfahrensvalidierung –
Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen
(urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines
Referenzverfahrens (ISO/DIS 16140-2:2012);
Deutsche Fassung prEN ISO 16140-2:2012**

Microbiology of food and animal feed –
Method validation –
Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference
method (ISO/DIS 16140-2:2012);
German version prEN ISO 16140-2:2012

Microbiologie des aliments –
Validation des méthodes –
Partie 2: Protocole pour la validation de méthodes alternatives (brevetées) par rapport à
une méthode de référence (ISO/DIS 16140-2:2012);
Version allemande prEN ISO 16140-2:2012

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2013-01-28 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses
Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de 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 nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann
im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter
www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im
DIN, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 70 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 16140-2:2012) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products, Unterkomitee SC 9, „Microbiology“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontalverfahren“, Arbeitsgruppe 6 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-12 AA "Validierung mikrobiologischer Verfahren" im Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN verantwortlich.

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 16140:2011-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Inhalt der Norm in mehrere Teile aufgeteilt;
- b) dieser Teil enthält die Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen anhand eines Referenzverfahrens
- c) Norm redaktionell überarbeitet.

**Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln —
Verfahrensvalidierung — Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von
alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines
Referenzverfahrens (ISO/DIS 16140-2:2012)**

Microbiologie des aliments — Validation des méthodes — Partie 2 : Protocole pour la validation de méthodes alternatives (brevetées) par rapport à une méthode de référence (ISO/DIS 16140-2:2012)

Microbiology of food and animal feed — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method (ISO/DIS 16140-2:2012)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.4e - RC2

Inhalt

Seite

Vorwort	4
Einleitung.....	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen.....	6
3 Begriffe	6
4 Allgemeine Prinzipien für die Validierung alternativer Verfahren	6
5 Qualitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Validierung	6
5.1 Verfahrensvergleichsuntersuchung	6
5.1.1 Allgemeine Betrachtungen	6
5.1.2 Paarweise und nicht paarweise Untersuchung	7
5.1.3 Untersuchung zur Empfindlichkeit	7
5.1.4 Untersuchung zur relativen Nachweisgrenze.....	12
5.1.5 Untersuchung zur Inklusivität und zur Exklusivität	14
5.2 Ringversuch	15
5.2.1 Allgemeine Betrachtungen	15
5.2.2 Untersuchungsvorschrift.....	15
5.2.3 Berechnungen und Zusammenfassung der Daten	17
5.2.4 Auswertung der Daten	20
6 Quantitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Validierung.....	21
6.1 Verfahrensvergleichsuntersuchung	21
6.1.1 Allgemeine Betrachtungen	21
6.1.2 Untersuchung zur relativen Richtigkeit.....	22
6.1.3 Untersuchung zum Genauigkeitsprofil.....	25
6.1.4 Untersuchung zur Bestimmungsgrenze	29
6.1.5 Untersuchung zur Inklusivität und Exklusivität	29
6.2 Ringversuch	31
6.2.1 Allgemeine Betrachtungen	31
6.2.2 Untersuchungsvorschrift.....	31
6.2.3 Berechnungen und Zusammenfassung von Daten.....	32
6.2.4 Auswertung der Daten	35
Anhang A (informativ) Einteilung von Probenarten und vorgeschlagene angestrebte Kombinationen für Validierungsuntersuchungen	36
Anhang B (normativ) Bevorzugte Reihenfolge für die Verwendung von natürlich und künstlich kontaminierten Proben in Validierungsuntersuchungen	45
Anhang C (informativ) Allgemeine Arbeitsvorschriften für die Kontamination durch Mischen und die künstliche Kontamination von Lebensmittelmatrices	46
C.1 Kontamination durch Mischen	46
C.2 Künstliche Kontamination von Lebensmitteln unter Anwendung der Arbeitsvorschrift für das Beimpfen	46
C.2.1 Künstliche Kontamination von Lebensmitteln mit hohem Feuchtegehalt mit einer flüssigen Kultur (Bouillon).....	46
C.2.2 Künstliche Kontamination von Lebensmitteln mit geringem Feuchtegehalt mit einer lyophilisierten Kultur	47
C.3 Künstliche Kontamination von Lebensmitteln unter Anwendung der Arbeitsvorschrift für das Aufstocken	48
Anhang D (informativ) Modelle für <i>RLOD</i> -Berechnungen unter Verwendung der Daten aus der Verfahrensvergleichsuntersuchung	49
D.1 Allgemeines	49

D.2	Bekannte Konzentrationen der Kontamination, Schätzung von <i>RLOD</i> mittels <i>LOD</i>	50
D.3	Bekannte Konzentrationen der Kontamination, direkte Berechnung der <i>RLOD</i>	50
D.4	Unbekannte Konzentrationen der Kontamination	50
Anhang E (normativ) Bei der Auswahl von Stämmen für die Untersuchung zur Inklusivität und Exklusivität zu berücksichtigende Aspekte.....		
E.1	Allgemeines	51
E.2	Kategorien von Zielgruppen.....	51
E.3	Auswahl der Zielgruppe für die Untersuchung zur Inklusivität.....	51
E.4	Auswahl der Nicht-Zielgruppe für die Untersuchung zur Exklusivität	52
Anhang F (informativ) Betrachtungen zu Berechnungen der relativen Nachweisgrenze (<i>RLOD</i>) zwischen Laboratorien, erhalten in einem Ringversuch.....		
Anhang G (informativ) Prinzip des Genauigkeitsprofils für die Validierung von quantitativen Modellen		
G.1	Annahmekriterium	57
G.2	Zugewiesener Bezugswert	57
G.3	Anteilsbereich.....	57
G.4	Prinzipien des Genauigkeitsprofils	58
Anhang H (informativ) Anwendung des Genauigkeitsprofils in der Verfahrensvergleichsuntersuchung		
Anhang I (informativ) Beispiel für die Anwendung des Genauigkeitsprofils bei einem Ringversuch		
Literaturhinweise		68

Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 16140-2:2012) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontalverfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Diese zweite Ausgabe annulliert und ersetzt die erste Ausgabe (ISO 16140:2003), die fachlich überarbeitet wurde.

ISO 16140 besteht unter dem Haupttitel *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Verfahrensvalidierung* aus den folgenden Teilen:

- *Teil 1: Terminologie*
- *Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens*

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 16140-2:2012 wurde vom CEN als prEN ISO 16140-2:2012 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

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.

Die Entwickler 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.

Der vorliegende Teil von ISO 16140 ist dafür vorgesehen, eine spezielle Arbeitsvorschrift und Leitlinien für die Validierung urheberrechtlich geschützter Verfahren bereitzustellen, die dafür bestimmt sind, als schnell und/oder leichter durchführbare Verfahren im Vergleich zum entsprechenden Referenzverfahren angewendet zu werden. Zusätzlich kann dieser Teil von ISO 16140 auch zur Validierung anderer, nicht urheberrechtlich geschützter Verfahren angewendet werden, die anstelle des Referenzverfahrens eingesetzt werden. Dieser Teil von ISO 16140 ist als Nachfolgedokument für die in der ersten Version von ISO 16140 (ISO 16140:2003) veröffentlichte Arbeitsvorschrift für die Validierung vorgesehen.

Die Anwendung dieser Norm schließt Fachwissen in den entsprechenden Bereichen, wie z. B. Mikrobiologie, statistische Planung und Auswertung, ein, wie es in den betreffenden Abschnitten angegeben ist. Das statistische Fachwissen umfasst einen Überblick über die Probenahmetheorie und die Versuchsplanung, die statistische Auswertung von mikrobiologischen Daten (von Koloniezahlen oder Prüfungen auf Vorhandensein/Nichtvorhandensein) und einen Überblick über die statistischen Begriffe zur Zufallsprobenahme, Heterogenität von Proben, Stabilität von Proben, Versuchsplanung, zu Varianzkomponenten.

Wenn dieser Teil von ISO 16140 das nächste Mal überprüft wird, werden sämtliche Informationen berücksichtigt werden, die dann in Bezug darauf, inwieweit die Leitlinien eingehalten wurden, und in Bezug auf die Gründe für Abweichungen davon im Fall bestimmter Produkte zur Verfügung stehen.

Die Harmonisierung von Validierungsverfahren kann nicht umgehend erfolgen und für bestimmte Gruppen von Produkten bestehen möglicherweise bereits Internationale Normen und/oder nationale Normen, die diesem horizontalen Verfahren nicht entsprechen. Es besteht die Hoffnung, dass derartige Normen, wenn sie überprüft werden, so geändert werden, dass sie ISO 16140 soweit entsprechen, dass die einzigen zum Schluss verbleibenden Abweichungen von diesem horizontalen Verfahren diejenigen sind, die aus gängigen technischen Gründen notwendig sind. Zum Beispiel behandelt ISO/DIS 16297, *Milk — Bacterial count — Protocol for the evaluation of alternative methods* eine sehr spezifische Validierung für einen spezifischen Gegenstand (der Hygienestatus von Rohmilchproben) und wird als eine vertikale Norm neben ISO 16140 bestehen bleiben. Im Fall der Notwendigkeit einer derartigen Validierung ist die vertikale Norm maßgeblich.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 16140 legt das allgemeine Prinzip und die technische Arbeitsvorschrift für die Validierung alternativer, zum Großteil urheberrechtlich geschützter, Verfahren auf dem Gebiet der mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln und Futtermitteln sowie von Umgebungsproben und Proben aus dem Bereich der Primärproduktion für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren fest. Validierungsuntersuchungen nach der vorliegenden Norm sollen von Organisationen durchgeführt werden, die an der Verfahrensvalidierung beteiligt sind.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 16140-1:—¹⁾, *Microbiology of food and animal feed — Method validation — Part 1: Vocabulary*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 16140-1:—.

4 Allgemeine Prinzipien für die Validierung alternativer Verfahren

Die Arbeitsvorschrift für die Validierung umfasst zwei Phasen:

- eine Verfahrensvergleichsuntersuchung des alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahrens anhand des Referenzverfahrens, durchgeführt im organisierenden Laboratorium;
- einen Ringversuch mit dem alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren im Vergleich zum Referenzverfahren, durchgeführt in verschiedenen Laboratorien.

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

5 Qualitative Verfahren — Technische Arbeitsvorschrift für die Validierung

5.1 Verfahrensvergleichsuntersuchung

5.1.1 Allgemeine Betrachtungen

Die Verfahrensvergleichsuntersuchung ist der Teil des Validierungsprozesses, der im organisierenden Laboratorium durchgeführt wird. Sie besteht aus drei Teilen:

- einer Vergleichsuntersuchung der Ergebnisse des Referenzverfahrens mit den Ergebnissen des alternativen Verfahrens bei (natürlich und/oder künstlich) kontaminierten Proben (sogenannte Untersuchung zur relativen Genauigkeit);
- einer Vergleichsuntersuchung zur Bestimmung der relativen Nachweisgrenze (*RLOD*) in künstlich kontaminierten Proben (sogenannte *RLOD*-Untersuchung);
- einer Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität des alternativen Verfahrens.

1) In Vorbereitung. (Überarbeitung von ISO 16140:2003)

5.1.2 Paarweise und nicht paarweise Untersuchung

Das Referenz- und das alternative Verfahren müssen nach Möglichkeit an genau derselben Probe (derselben Untersuchungsprobe) durchgeführt werden. Es wird jedoch zwischen Untersuchungen unterschieden, in denen für das Referenz- und das alternative Verfahren dieselbe Untersuchungsprobe verwendet werden kann, weil beide Verfahren über genau den gleichen ersten Schritt im Anreicherungsverfahren verfügen, und Untersuchungen, in denen unterschiedliche Untersuchungsproben für das Referenz- und das alternative Verfahren verwendet werden müssen (z. B. aufgrund unterschiedlicher Anreicherungsbouillons). Wenn für beide Verfahren dieselbe Untersuchungsprobe verwendet wird, sind die Ergebnisse beider Verfahren eng miteinander verbunden. Wenn zum Beispiel eine Probe nicht kontaminiert ist, sollten beide Verfahren zu dem Ergebnis gelangen, dass die Probe negativ ist. Aufgrund dieses Zusammenhangs werden die vom Referenz- und vom alternativen Verfahren erzeugten Daten als **gepaart** oder abgestimmt bezeichnet. In der vorliegenden Norm wird für diese Art der Untersuchung die Formulierung „paarweise Untersuchung“ verwendet.

Der umgekehrte Fall, wenn kein gemeinsamer Anreicherungsschritt für das Referenz- und das alternative Verfahren vorhanden ist, ist auch möglich. In diesem Fall sind verschiedene Untersuchungsproben, die aus derselben Charge oder demselben Los eines (Lebensmittel-)Produkts stammen, für jedes Verfahren zu verwenden und die sich ergebenden Daten werden als **ungepaart** oder nicht abgestimmt bezeichnet. In der vorliegenden Norm wird für diese Art der Untersuchung die Formulierung „nicht paarweise Untersuchung“ verwendet. Die Entscheidung, ob eine **paarweise** oder eine **nicht paarweise** Untersuchung vorliegt, hängt von den Arbeitsvorschriften für das Referenzverfahren und das alternative Verfahren ab. Wenn ein gemeinsamer erster Schritt in den Anreicherungsverfahren vorhanden ist, dann ist eine **paarweise** Untersuchung verbindlich vorgeschrieben.

Ein mit einem alternativen Verfahren erhaltenes positives Ergebnis muss im Allgemeinen bestätigt werden, um zu bestimmen, ob das Ergebnis ein richtig positives oder falsch positives Ergebnis ist. Diese Bestätigung ist nur für den Teil zur Genauigkeitsuntersuchung notwendig. Sämtlich mit dem alternativen Verfahren bei einer **nicht paarweisen** Untersuchung erhaltenen positive Ergebnisse müssen bestätigt werden. Bei einer **paarweisen** Untersuchung müssen nur die mit dem alternativen Verfahren erhaltenen positiven Ergebnisse bestätigt werden, bei denen das zugehörige Ergebnis des Referenzverfahrens negativ war. Das Bestätigungsverfahren sollte so ausgelegt sein, dass ein Isolat des Zielorganismus erhalten wird. In den meisten Fällen beruht es auf dem Referenzverfahren. Das ist jedoch nicht zwingend notwendig.

In diesem Abschnitt ist die Verfahrensvergleichsuntersuchung für den Fall beschrieben, dass das Referenz- und das alternative Verfahren einen gemeinsamen ersten Schritt im Anreicherungsverfahren haben (**paarweise** Untersuchung), und für den Fall, dass das Referenz- und das alternative Verfahren keinen gemeinsamen ersten Schritt im Anreicherungsverfahren haben (**nicht paarweise** Untersuchung). Unterschiede zwischen beiden Arten von Untersuchungen sind gegebenenfalls im Text angeführt.

5.1.3 Untersuchung zur Empfindlichkeit

Die Untersuchung zur Empfindlichkeit ist das Vermögen, den Analyten nachzuweisen. Die Untersuchung wird unter Verwendung natürlich und/oder künstlich kontaminierter Proben durchgeführt. In diesem Zusammenhang werden verschiedene Lebensmittelkategorien und -arten untersucht.

5.1.3.1 Auswahl von zu verwendenden Lebensmittel- und anderen Kategorien

Die Auswahl der bei der Validierung verwendeten (Lebensmittel-)Kategorien und Arten hängt von der Art oder Gruppe von Mikroorganismen und dem Anwendungsbereich der Validierung ab.

Falls das Verfahren auf „alle Lebensmittel“ anzuwenden ist, sind fünf Lebensmittelkategorien zu untersuchen. Im Bericht zur Validierungsuntersuchung werden die in der Untersuchung verwendeten Lebensmittelkategorien angegeben. Wenn das Verfahren für eine begrenzte Anzahl von Lebensmittelkategorien zu validieren ist, z. B. „verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte“ und „wärmebehandelte Milch und Milchprodukte“, dann erfordern nur diese Kategorien eine Untersuchung. Neben den Lebensmittelkategorien können Futtermittelproben, Umgebungsproben und Proben aus dem Bereich der Primärproduktion als zusätzliche Kategorien einbezogen werden. Das erweitert die Anwendungsmöglichkeit des alternativen Verfahrens in Bezug auf diese zusätzlichen Kategorien.

Für alle gewählten Kategorien (Lebensmittel und andere) müssen mindestens drei verschiedene (Lebensmittel-)Arten je Kategorie in die Untersuchung einbezogen werden. In Anhang A ist eine Übersicht über die betreffenden (Lebensmittel-)Arten und (Lebensmittel-)Kategorien je Art des Mikroorganismus angeführt, die für die Validierung von Bedeutung sein können. Dieser Anhang sollte angewendet werden, um die Auswahl von Lebensmittelarten und Einheiten für die betroffene Mikroorganismenart zu erleichtern. Er sollte nicht als verbindlich vorgeschrieben betrachtet werden.

Bei der Auswahl von Proben für die Untersuchung ist es von höchster Wichtigkeit, solche Proben zu finden, die natürlich kontaminiert sind. Falls es nicht möglich ist, eine ausreichende Anzahl natürlich kontaminierter Proben zu beschaffen, ist die künstliche Kontamination von Proben erlaubt (siehe Anhang B und Anhang C). Es ist wünschenswert, dass Lebensmittelproben aus einem möglichst großem Verbreitungsgebiet kommen, um eine mögliche systematische Abweichung aufgrund örtlich vorkommender Lebensmittelspezialitäten zu verringern und den Bereich der Validierung zu erweitern.

Es ist sicherzustellen, dass mit der Auswahl der verschiedenen (Lebensmittel-)Arten sowohl hohe als auch niedrige (natürliche) Gehalte an Begleitflora, verschiedene verarbeitungsbedingte Arten der Belastung (Stress) und rohe (nicht verarbeitete) (Lebensmittel-)Einheiten in die Untersuchung einbezogen werden.

BEISPIEL Für die Validierung eines Verfahrens zum Nachweis von *Listeria monocytogenes* in der Lebensmittelkategorie „verzehrfertige, aufwärmfertige Fleischprodukte“ können folgende Lebensmittelarten verwendet werden: (1) gekochte Fleischprodukte (geringer Gehalt an Begleitflora, Hitzestress), (2) fermentierte oder getrocknete Fleischprodukte (hoher Gehalt an Begleitflora, pH-Wert-bedingter Stress) und roh gepökelte (geräucherte) Fleischprodukte ($a_w < 0,92$) (mittlerer Gehalt an Begleitflora, durch den a_w -Wert bedingter Stress).

ANMERKUNG In einigen Fällen, zum Beispiel bei einem alternativen Verfahren, das auf alle Lebensmittel anwendbar ist, ist es möglich, die Kategorien „verzehrfertig“ und „roh“ derselben Produktgruppe zu kombinieren. Zum Beispiel können die Kategorien rohes und verzehrfertiges Fleisch (Produkte) in einer Kategorie zusammengefasst werden, die drei Arten umfasst, die nach den betreffenden rohen und verzehrfertigen Lebensmittelarten aufgeteilt sind.

5.1.3.2 Anzahl der Proben

Für jede zu untersuchende Kategorie müssen mindestens 60 Proben untersucht werden und es müssen mindestens 3 Arten innerhalb dieser Kategorie verwendet werden. Für jede Art müssen mindestens 20 Proben, die für diese (Lebensmittel-)Art repräsentativ sind, untersucht werden; das ergibt ein Minimum von 60 Proben je untersuchter Kategorie, wenn mindestens drei verschiedene Arten verwendet werden. Für jede untersuchte Art müssen entweder mit dem Referenzverfahren oder mit dem alternativen Verfahren teilweise positive Ergebnisse erhalten werden (d. h. die Proben sollten nicht alle positiv bzw. nicht alle negativ sein). Im Idealfall sollten je Art 10 untersuchte Proben (50 %) positiv und 10 negativ sein. In jeder Kategorie müssen mindestens 30 Proben unter Anwendung des Referenzverfahrens und/oder des alternativen Verfahrens zu einem positiven Ergebnis führen.

5.1.3.3 Berechnung und Auswertung der relativen Genauigkeit

Im Allgemeinen müssen die Daten in einem Bericht dargestellt werden, um einen Überblick über die erhaltenen Rohdaten zu erhalten, und es müssen Angaben zu der Art der Kontamination (natürlich kontaminiert oder künstlich kontaminiert) der verwendeten Proben und der Art des angewendeten Versuchsaufbaus (z. B. **paarweise** Untersuchung oder **nicht paarweise** Untersuchung) gemacht werden. Bei künstlich kontaminierten Proben muss (der Verweis auf) das zur Herstellung angewendete Verfahren genau angegeben sein (siehe auch Anhang C).

Die erhaltenen Ergebnisse des Referenz- und des alternativen Verfahrens sind in bei einer **paarweisen** Untersuchung nach Tabelle 1 und bei einer **nicht paarweisen** Untersuchung nach Tabelle 2 zu erfassen. Sowohl Tabelle 1 als auch Tabelle 2 wird für jede (Lebensmittel-)Kategorie (> 60 Proben) und (Lebensmittel-)Art (> 20 Proben) erstellt. Wenn das in der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens enthaltene Bestätigungsverfahren auf dem Bestätigungsverfahren des Referenzverfahrens beruht, ist keine zusätzliche Bestätigung notwendig. Die Ergebnisse des alternativen Verfahrens werden dann als Endergebnisse angesehen und für die Berechnung verwendet. In allen anderen Fällen ist eine Bestätigung erforderlich.

Tabelle 1 — Vergleich der Ergebnisse zwischen dem Referenz- und dem alternativen Verfahren bei einer paarweisen Untersuchung

Ergebnis des Referenzverfahrens (einschließlich der im Rahmen des Referenzverfahrens erforderlichen Bestätigungen)	Ergebnis des alternativen Verfahrens (einschließlich der Bestätigungen, falls im Rahmen der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens gefordert)	Bestätigtes Ergebnis des alternativen Verfahrens (einschließlich aller Bestätigungen, die zum Nachweis des mutmaßlichen Ergebnisses des alternativen Verfahrens angewendet wurden)	Deskriptor der gepaarten Daten (Symbol)
+	+	Nicht notwendig ^a	Positive Übereinstimmung (<i>PA</i>)
+	–	Nicht notwendig ^a	Falsch negativ (<i>FN</i>)
–	–	Nicht notwendig ^a	Negative Übereinstimmung (<i>NA</i>)
–	+	–	Falsch positiv (<i>FP</i>)
–	+	+	Positivabweichung (<i>PD</i>)

^a In diesem Fall ist keine Bestätigung des Ergebnisses des alternativen Verfahrens notwendig.

Tabelle 2 — Vergleich der Ergebnisse zwischen dem Referenz- und dem alternativen Verfahren bei einer nicht paarweisen Untersuchung

Ergebnis des Referenzverfahrens (einschließlich der im Rahmen des Referenzverfahrens erforderlichen Bestätigungen)	Ergebnis des alternativen Verfahrens (einschließlich der Bestätigungen, falls im Rahmen der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens gefordert)	Bestätigtes Ergebnis des alternativen Verfahrens (einschließlich aller Bestätigungen, die zum Nachweis des mutmaßlichen Ergebnisses des alternativen Verfahrens angewendet wurden)	Deskriptor der ungepaarten Daten (Symbol)
+	+	+	Positive Übereinstimmung (<i>PA</i>)
+	+	–	Falsch positiv 1. Art (<i>FP1</i>)
+	–	–	Negativabweichung (<i>ND</i>)
+	–	+	Falsch negativ (<i>FN</i>)
–	–	Nicht notwendig ^a	Negative Übereinstimmung (<i>NA</i>)
–	+	–	Falsch positiv 2. Art (<i>FP2</i>)
–	+	+	Positivabweichung (<i>PD</i>)

^a In diesem Fall ist keine Bestätigung des Ergebnisses des alternativen Verfahrens notwendig.

Jede Tabelle kombiniert die (bestätigten) Ergebnisse von dem alternativen Verfahren bezogen auf das Ergebnis des Referenzverfahrens. Im Fall einer **paarweisen** Untersuchung ist die Bestätigung des positiven Ergebnisses, das mit dem alternativen Verfahren erhalten wurde, nur in dem Fall notwendig, wenn das mit dem Referenzverfahren für dieselbe Probe erhaltene Ergebnis negativ ist. Im Fall einer **nicht paarweisen** Untersuchung ist die Bestätigung für alle mit dem alternativen Verfahren erhaltenen positiven Ergebnisse notwendig und für alle mit dem alternativen Verfahren erhaltenen negativen Ergebnisse, wenn die zugehörigen Ergebnisse des Referenzverfahrens positiv sind. Das bedeutet, dass bei einer **nicht paarweisen** Untersuchung nur die Ergebnisse mit negativer Übereinstimmung nicht bestätigt werden.

Auf der Grundlage der Ergebnisse für die **paarweise** Untersuchung aus Tabelle 1 für die kombinierten Kategorien je Kategorie und Art sind die Werte für die Empfindlichkeit des Referenzverfahrens und des alternativen Verfahrens sowie die relative Genauigkeit, Spezifität und Empfindlichkeit nach der zusätzlichen Bestätigung der Ergebnisse wie folgt zu berechnen:

- Empfindlichkeit für das alternative Verfahren: $SE_{alt} = \frac{(PA + PD)}{(PA + FN + PD)} \times 100\%$
- Empfindlichkeit für das Referenzverfahren: $SE_{ref} = \frac{(PA + ND)}{(PA + FN + PD)} \times 100\%$
- Relative Genauigkeit: $AC = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\%$
- Relative Spezifität: $SP = \frac{NA}{(NA + FP + PD)} \times 100\%$
- Relative Empfindlichkeit: $SE = \frac{PA}{(PA + FN)} \times 100\%$
- Falsch-negativ-Rate: $\frac{FN}{N} \times 100\%$.

Dabei ist

N die Gesamtanzahl der Proben ($NA + PA + PD + FP + FN$)

Auf der Grundlage der Ergebnisse für die **nicht paarweise** Untersuchung aus Tabelle 2 für die kombinierten Kategorien je Kategorie und Art sind die Werte für die Empfindlichkeit des Referenzverfahrens und des alternativen Verfahrens sowie die relative Genauigkeit, Spezifität und Empfindlichkeit nach der zusätzlichen Bestätigung der Ergebnisse wie folgt zu berechnen:

- Relative Empfindlichkeit für das alternative Verfahren: $SE_{alt} = \frac{(PA + FN + PD)}{(PA + FN + PD + ND + FP1)} \times 100\%$
- Relative Empfindlichkeit für das Referenzverfahren: $SE_{ref} = \frac{(PA + FN + ND + FP1)}{(PA + FN + ND + FP1 + PD)} \times 100\%$
- Relative Genauigkeit: $AC = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\%$
- Relative Spezifität: $SP = \frac{NA}{(NA + FP2 + PD)} \times 100\%$
- Relative Empfindlichkeit: $SE = \frac{PA}{(PA + FN + ND + FP1)} \times 100\%$
- Falsch-negativ-Rate: $\frac{FN}{N} \times 100\%$
- Falsch-positiv-Rate: $\frac{(FP1 + FP2)}{N} \times 100\%$

Dabei ist

N die Gesamtanzahl der Proben ($NA + PA + PD + ND + FN + FP1 + FP2$)

Die erhaltenen Ergebnisse können auch wie in Tabelle 3 dargestellt zusammengefasst werden.

Tabelle 3 — Zusammenfassung der mit dem Referenzverfahren und dem alternativen Verfahren für jede Kategorie und Art erhaltenen Ergebnisse

Kategorie	Positive Übereinstimmung (PA)	Negative Übereinstimmung (NA)	Negativabweichung (ND)	Positivabweichung (PD)	Falsch positive Ergebnisse ($FP(1+2)$)	Falsch negative Ergebnisse (FN)	Summe (N)	Empfindlichkeit, alternatives Verfahren SE_{alt} (%)	Empfindlichkeit, Referenzverfahren SE_{ref} (%)	Relative Genauigkeit AC (%)	Relative Spezifität SP (%)	Relative Empfindlichkeit SE (%)	% Falsch negative Ergebnisse (FN)	% Falsch positive Ergebnisse ($FP(1+2)$)
Kategorie 1: — Alle Arten — Art 1 — Art 2 — Art 3														
Kategorie 2: — Alle Arten — Art 1 — Art 2 — Art 3														
Kategorie x: — Alle Arten — Art 1 — Art 2 — Art 3														

Die nach der Bestätigung erhaltenen Daten werden verwendet um zu bestimmen, ob das alternative Verfahren zu Ergebnissen führt, die mit denen des Referenzverfahrens vergleichbar sind.

Bei einer **paarweisen** Untersuchung sind die Differenz zwischen ($FN - PD$) und die Summe von ($FN + PD$) zu berechnen. Es ist zu überprüfen, ob die Differenz und die Summe aus PD und FN der in Tabelle 4 in Bezug auf die Anzahl der bei der Bewertung verwendeten Kategorien angeführten Zulässigkeitsgrenze (AL) entsprechen.

Bei einer **nicht paarweisen** Untersuchung ist die Differenz zwischen ($(ND + FP1 + FN) - PD$) zu berechnen. Es ist zu überprüfen, ob die Differenz aus PD und ND der in Tabelle 4 in Bezug auf die Anzahl der bei der Bewertung verwendeten Kategorien angeführten AL entspricht.

Tabelle 4 — Parameter der Zulässigkeitsgrenze und Werte für eine gepaarte und eine nicht gepaarte Untersuchung in Bezug auf die Anzahl der verwendeten Kategorien

Anzahl der Kategorien	Gepaarte Untersuchung		Nicht gepaarte Untersuchung
	$(FN^a \text{ — } PD^b)$	$(FN \text{ — } PD)$	$((ND^c \text{ — } FP1^d \text{ — } FN) \text{ — } PD)$
1	3	6	3
2	4	8	4
3	5	10	5
4	5	12	5
5	5	14	5
6	6	16	6
7	6	18	7
8	6	20	7

- ^a FN = Anzahl der Proben mit falsch negativen Ergebnissen (paarweise und nicht paarweise Untersuchung)
^b PD = Anzahl der Proben mit Ergebnissen mit Positivabweichung (paarweise und nicht paarweise Untersuchung)
^c ND = Anzahl der Proben mit Ergebnissen mit Negativabweichung (nicht paarweise Untersuchung)
^d $FP1$ = Anzahl der Proben mit falsch positiven Ergebnissen der 1. Art (nicht paarweise Untersuchung)

5.1.4 Untersuchung zur relativen Nachweisgrenze

Zur Bewertung der Nachweisgrenze (LOD) des alternativen Verfahrens im Vergleich zum Referenzverfahren wird eine Vergleichsuntersuchung durchgeführt. Die Bewertung beruht auf der Berechnung der relativen Nachweisgrenze ($RLOD$). In der Untersuchung werden vorbereitete Parallelproben von künstlich kontaminierten Proben bei 3 oder mehr Konzentrationen der Kontamination verwendet. Die Konzentrationen sollten vorzugsweise bekannt sein, da das die Berechnung der LOD ermöglicht. Es ist jedoch nicht erforderlich. Wenn die Konzentrationen nicht bekannt sind, wird nur die $RLOD$ berechnet.

Die für die Bewertung der $RLOD$ verwendeten (Lebensmittel-)Arten müssen sich von denen unterscheiden, die bei der Untersuchung zur Genauigkeit verwendet wurden. Mit dem alternativen Verfahren erhaltene positiv abweichende Untersuchungsergebnisse müssen zusätzlich bestätigt werden (siehe 5.1.3.3). Die $RLOD$ muss vor und nach der Bestätigung bewertet werden.

5.1.4.1 Auswahl der (Lebensmittel-)Kategorien und Anzahl von untersuchten Proben und Parallelproben

Hinsichtlich der Auswahl von (Lebensmittel-)Kategorien und (Lebensmittel-)Arten siehe 5.1.3.1. Es werden die gleichen Kategorien verwendet, die auch für die Untersuchung zur Genauigkeit (5.1.3) gewählt wurden. Für jede Kategorie wird eine (Lebensmittel-)Art gewählt. Um die bewertete Kategorie besser darzustellen, muss sich diese Art (wenn möglich) von der in der Untersuchung zur Genauigkeit verwendeten Art unterscheiden. Die Proben müssen künstlich beimpft werden. Verfahren zur Herstellung von künstlich beimpften Proben sind in Anhang C angeführt. Jede (Lebensmittel-)Art wird mit einem anderen Stamm beimpft.

Je (Lebensmittel-)Art werden mindestens drei Konzentrationen hergestellt, die mindestens eine Konzentration als Negativkontrolle, eine geringe und eine höhere Konzentration umfassen. Idealerweise muss die geringe Konzentration die theoretische Erfassungsgrenze (d. h. 0,7 KBE je Prüfmenge) sein und die höhere Konzentration gerade oberhalb der theoretischen Erfassungsgrenze (z. B. 1 KBE bis 1,5 KBE je Prüfmenge) liegen. Als Mindestanforderung sollte mindestens die geringe Konzentration bei beiden Verfahren zu einer teilweisen Wiederfindung führen. Ein Schätzwert für die Konzentration der Kontamination (mit Ausnahme der Negativkontrolle) sollte ermittelt werden. Bei der Konzentration der Negativkontrolle sollten mit beiden Verfahren mindestens 5 Parallelproben untersucht werden, bei der zweiten (geringen) Konzentration (theoretische Erfassungsgrenze) mindestens 20 und bei der dritten (höheren) Konzentration mindestens 5 Parallelproben.

ANMERKUNG 1 Um besser sicherzustellen, dass eine teilweise Wiederfindung erreicht wird, können mehr Konzentrationen der Kontamination hergestellt und untersucht werden.

ANMERKUNG 2 Wenn das alternative Verfahren eine viel geringere *LOD* hat als das Referenzverfahren, hat die benötigte Konzentration der Kontamination die *LOD* des Referenzverfahrens zum Ziel.

5.1.4.2 Berechnung und Auswertung der *RLOD*

Die *RLOD* ist definiert als das Verhältnis der *LOD* des alternativen Verfahrens und des Referenzverfahrens:

$$RLOD = \frac{LOD_{alt}}{LOD_{ref}}$$

Für jede Lebensmittelkategorie müssen mindestens die *RLOD* durch Anpassung eines komplementären log-log-Modells (en: complementary-log-log, CLL) an die kombinierten Daten zu Nichtvorhandensein/Vorhandensein beider Verfahren als Funktion des Verfahrens geschätzt werden. Die Konzentrationen der Kontamination werden für die Berechnungen der *RLOD* nicht benötigt, da sie im Modell enthalten sind, was zu Kurven führt, die die Nachweiswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit vom Logarithmus der Dosis (Konzentration der Kontamination) darstellen. Das statistische Modell und die Berechnungen sind in Anhang D ausgearbeitet. Die Berechnungen können mit der Excel-Tabellenkalkulation der vorliegenden Internationalen Norm durchgeführt werden. Die Excel-Tabellenkalkulation zur Berechnung der *RLOD*-Werte steht unter folgendem Link zur Verfügung: <http://www.wiwiiss.fu-berlin.de/institute/iso/mitarbeiter/wilrich/>; anschließend ist die *RLOD*-Datei auszuwählen. Für Berechnungen unter Anwendung dieser Excel-Tabellenkalkulation ist die Option „unbekannte Konzentration“ zu verwenden.

Für jede Matrix *i* sind die *RLOD_i* und die Prüfgröße $|z_i|$ für die Abweichung vom theoretischen Wert *RLOD_i* = 1 (bei dem 95%-Vertrauensniveau) zu berechnen. Die Ergebnisse sind wie in Tabelle 5 dargestellt zu erfassen.

Tabelle 5 — Darstellung der *RLOD* vor und nach der Bestätigung der Ergebnisse des alternativen Verfahrens

	<i>RLOD</i> unter Verwendung der Ergebnisse des alternativen Verfahrens		<i>RLOD</i> unter Verwendung der bestätigten Ergebnisse des alternativen Verfahrens	
Kategorie (<i>i</i>)	<i>RLOD_i</i>	$ z_i $	<i>RLOD_i</i>	$ z_i $
1				
2				
...				
<i>k</i>				
Kombiniert				

Eine Zulässigkeitsgrenze (*AL*) für die *RLOD*, auf der Grundlage der bestätigten Ergebnisse der alternativen Verfahren, legt die maximale Zunahme der *LOD* des alternativen Verfahrens im Vergleich zum Referenzverfahren fest, die bei der Betrachtung der Gebrauchstauglichkeit des Verfahrens nicht als bedeutend angesehen wird. Folglich wird *AL* ein Wert von > 1 sein. Die Auswertung sollte für jede (Lebensmittel-)Kategorie getrennt erfolgen, wobei die innerhalb der Kategorien untersuchten (Lebensmittel-)Arten zu berücksichtigen sind, und für die kombinierten Ergebnisse aller Kategorien.

Die *AL* für eine **paarweise** Untersuchung wird auf 1,5 festgelegt, was bedeutet, dass die *LOD* des alternativen Verfahrens nicht mehr als das 1,5-Fache größer sein kann als die *LOD* des Referenzverfahrens. Ein *LOD*-Wert für das alternative Verfahren, der kleiner ist als der *LOD*-Wert des Referenzverfahrens, wird immer angenommen, weil das bedeutet, dass mit dem alternativen Verfahren wahrscheinlich geringere Konzentrationen der Kontamination nachgewiesen werden als mit dem Referenzverfahren.

Die *AL* für eine **nicht paarweise** Untersuchung wird auf 2,5 festgelegt, was bedeutet, dass die *LOD* des alternativen Verfahrens nicht mehr als das 2,5-Fache größer sein kann als die *LOD* des Referenzverfahrens. Ein *LOD*-Wert für das alternative Verfahren, der kleiner ist als der *LOD*-Wert des Referenzverfahrens, wird immer angenommen, weil das bedeutet, dass mit dem alternativen Verfahren wahrscheinlich geringere Konzentrationen der Kontamination nachgewiesen werden als mit dem Referenzverfahren.

Neben der Berechnung der *RLOD* wird empfohlen, die Daten unter Anwendung des von Wehling u. a. [11] beschriebenen *POD*-Modells (Nachweiswahrscheinlichkeitsmodells) zu bewerten. Die Bewertung unter Anwendung des *POD*-Modells sollte zusätzliche Informationen zur Gleichwertigkeit der Verfahren liefern.

5.1.5 Untersuchung zur Inklusivität und zur Exklusivität

5.1.5.1 Auswahl und Anzahl von Prüfstämmen

Es ist ein Spektrum von Stämmen zu verwenden. Die Kriterien für die Auswahl von Prüfstämmen sind in Anhang E angegeben. Die verwendeten Stämme sollten das Messprinzip des alternativen Verfahrens (z. B. kulturbasiert, Immunoassay-basiert, molekular) berücksichtigen. Verschiedene Messprinzipien erfordern möglicherweise die Verwendung verschiedener Prüflisten von Stämmen.

Jeder verwendete Stamm muss ausreichend detailliert biochemisch, serologisch und/oder genetisch charakterisiert sein, damit seine Identität bekannt ist. Die Stämme sollten unter Berücksichtigung des Anwendungsbereichs der Validierung vorzugsweise aus Lebensmitteln, Futtermitteln, der Umgebung bei der Lebensmittelherstellung oder dem Bereich der Primärproduktion isoliert worden sein. Es können jedoch auch klinische Stämme, Umweltstämme und Stämme aus Kultursammlungen verwendet werden. Die ursprüngliche Quelle aller Isolate sollte bekannt sein und sie sollten in einer örtlichen (z. B. Expertenlaboratorium), nationalen oder internationalen Kultursammlung aufbewahrt werden, damit sie bei Bedarf in zukünftigen Untersuchungen verwendet werden können.

Bei der Untersuchung zur Inklusivität müssen mindestens 50 Reinkulturen von Mikroorganismen untersucht werden. Bei der Untersuchung zur Inklusivität im Fall von Verfahren für Salmonellen müssen mindestens 100 Reinkulturen verschiedener Serotypen von *Salmonella* untersucht werden.

Bei der Untersuchung zur Exklusivität müssen mindestens 30 Reinkulturen von Mikroorganismen untersucht werden.

5.1.5.2 Beimpfen mit Zielstämmen (Inklusivität)

Jede Untersuchung wird einmal und nur mit dem alternativen Verfahren durchgeführt und es wird keine (Lebensmittel-)Probe hinzugefügt. Das Beimpfen eines geeigneten Wachstumsmediums erfolgt mit einer Verdünnung einer Reinkultur jedes Prüfstamms. Diese Kultur wird zur Untersuchung der Inklusivität verwendet.

Die Beimpfungskonzentration sollte 10-mal bis 100-mal größer sein als die kleinste Erfassungsgrenze des zu validierenden alternativen Verfahrens bei Anwendung der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens, einschließlich aller in den Anweisungen des alternativen Verfahrens ausführlich dargelegten Anreicherungen. Wenn das alternative Verfahren mehr als eine Arbeitsvorschrift zur Anreicherung einschließt (z. B. für verschiedene Probenarten), dann ist die anspruchvollste Vorschrift mit der vollständigen Liste der Prüfstämme anzuwenden. Wenn negative oder zweifelhafte Ergebnisse erhalten werden, sollte die Untersuchung wiederholt werden, wobei das Referenzverfahren einzubeziehen ist, um zu überprüfen, ob der Stamm mit dem geeigneten Referenzverfahren nachgewiesen werden könnte. Wenn die Ergebnisse negativ sind, kann in Betracht gezogen werden, die Untersuchung unter Zugabe einer Lebensmittelmatrix zu wiederholen. Wenn die alternative Arbeitsvorschrift einen Bestätigungsschritt einschließt, müssen Untersuchungen zur Bestätigung in die Untersuchung der ausgewählten Stämme einbezogen werden.

5.1.5.3 Beimpfen mit Nicht-Zielstämmen (Exklusivität)

Jede Untersuchung wird einmal und nur mit dem alternativen Verfahren durchgeführt. Das Beimpfen des Wachstumsmediums erfolgt mit einer Verdünnung einer Reinkultur jedes Prüfstamms. Diese Kultur wird zur Untersuchung der Inklusivität verwendet. Am Anfang wird keine Lebensmittelprobe hinzugefügt.

Die Reinkultur sollte in einer nicht selektiven Bouillon unter optimalen Wachstumsbedingungen vermehrt werden, um in der stationären Phase hohe Zellpopulationen zu erhalten. Wenn das Verfahren vor einem Nachweisschritt ein Wachstum in einem selektiven Medium einschließt, dann sollte zum Zweck der Untersuchung der Exklusivität das selektive Medium durch ein nicht selektives Medium ersetzt werden. Wenn mit dem alternativen Verfahren positive oder zweifelhafte Ergebnisse erhalten werden, sollte die Untersuchung wiederholt werden, wobei die vollständige in den Anweisungen des alternativen Verfahrens empfohlene Arbeitsvorschrift zur Anreicherung Anwendung findet, unter Verwendung selektiver Anreicherungen, wenn diese in den Anweisungen vermerkt sind. Wenn das alternative Verfahren mehr als eine Art der Anreicherung einschließt (z. B. für verschiedene Probenarten), dann sollte jede davon mit der vollständigen Liste der Prüfstämme angewendet werden. Außerdem sollte das Referenzverfahren angewendet werden, um zu prüfen, dass der Stamm nicht mit dem Referenzverfahren nachgewiesen werden kann.

5.1.5.4 Angabe und Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse sind nach Tabelle 6 zu erfassen. Die Auswertung muss durch das mit der Verfahrensvergleichsuntersuchung beauftragte Laboratorium erfolgen. Im Bericht sollten alle Abweichungen von den erwarteten Ergebnissen angeführt werden.

Tabelle 6 — Darstellung der Ergebnisse für die Selektivität

Mikroorganismen	Alternatives Verfahren	
	Erwartete Ergebnisse	Tatsächliche Ergebnisse
Zielstämmen (Inklusivität)		
1		
2		
usw.		
Nicht-Zielstämmen (Exklusivität)		
1		
2		
usw.		

5.2 Ringversuch

5.2.1 Allgemeine Betrachtungen

Das Ziel des Ringversuches ist die Bestimmung der Schwankungen der von verschiedenen Teilnehmern bei Verwendung identischer Proben (Vergleichbedingungen) erhaltenen Ergebnisse. Nach Möglichkeit sollten die Versuchsbedingungen die normale Streuung zwischen Laboratorien widerspiegeln. Der Unterschied zwischen **paarweisen** und **nicht paarweisen** Untersuchungen ist im Text angezeigt. Es erfolgt jedoch keine Teilung in getrennte Abschnitte, da die Auswirkung auf die Untersuchungsvorschrift und die Auswertung der Daten begrenzt ist. Der Ringversuch wird vom organisierenden Laboratorium organisiert.

5.2.2 Untersuchungsvorschrift

Der Ringversuch muss zu 10 gültigen Daten von mindestens 10 Teilnehmern führen. Die Teilnehmer müssen aus mindestens 5 verschiedenen Organisationen, vorzugsweise jedoch 10 Organisationen, stammen, wobei das organisierende Laboratorium ausgenommen ist. Facharbeiter (Techniker), die an der Vorbereitung der im Ringversuch verwendeten Proben beteiligt waren, dürfen nicht an der Untersuchung dieser Proben im Rahmen des Ringversuchs teilnehmen.

ANMERKUNG Laboratorien an unterschiedlichen Standorten, die jedoch zu einem Unternehmen oder Institut gehören, werden als verschiedene Organisationen zugelassen.

Es gilt folgende Arbeitsvorschrift:

- In den Fällen, in denen für das alternative Verfahren unterschiedliche Arbeitsvorschriften für die Anreicherung vorliegen, muss eine anspruchsvolle Vorschrift für die Anreicherung gewählt werden, z. B. die Vorschrift mit der kürzesten Bebrütungsdauer oder mit besonders selektiven Anreicherungsbedingungen. Die gewählte Lebensmitteleinheit muss für die gewählte Anreicherungsverfahren relevant sein. Diese relevante Lebensmitteleinheit (hinsichtlich der Auswahl siehe Anhang A), die zur Herstellung der Untersuchungsproben verwendet wird, sollte eine natürliche Begleitflora enthalten.
- Das Lebensmittel ist mit dem Zielkeim zu beimpfen. Die Arbeitsvorschrift für das Beimpfen der Lebensmittelproben muss für das ausgewählte Lebensmittel geeignet sein. Die Proben müssen vom organisierenden Laboratorium vorbereitet werden, um die Homogenität zwischen den Proben sicherzustellen; dabei sind die in Anhang B und Anhang C enthaltenen Vorschriften zur Vorbereitung der Matrices anzuwenden.
- Es sind mindestens drei verschiedene Konzentrationen der Kontamination je Lebensmittel zu verwenden: eine Negativkontrolle (L_0) und zwei Konzentrationen (L_1 und L_2). Mindestens eine davon sollte zu teilweise positiven Ergebnissen führen. Die Konzentration der Kontamination, die für eine teilweise Wiederfindung benötigt wird, muss auf den Daten aus der Untersuchung zur *RLOD* des Referenzverfahrens in der Vergleichsuntersuchung beruhen. Theoretisch ist eine mittlere Konzentration der Kontamination von 1 KBE/Probe angemessen, um eine teilweise Wiederfindung zu erreichen.
- Für jede Konzentration der Kontamination werden von jedem Teilnehmer mindestens acht Parallelblindproben mit beiden Verfahren untersucht. Daraus ergeben sich insgesamt mindestens 48 Ergebnisse (8 Wiederholungsuntersuchungen $\times$ 3 Konzentrationen $\times$ 2 Verfahren) je Teilnehmer.
- Bei Untersuchungen, die zu gepaarten Ergebnissen führen (gepaarte Ergebnisse treten auf, wenn die primäre Anreicherung bei dem alternativen Verfahren und dem Referenzverfahren gleich ist) ist eine Probe erforderlich, um ein Ergebnis für das alternative und das Referenzverfahren zu erhalten. Bei Untersuchungen, die zu **ungepaarten** Ergebnissen führen (**ungepaarte** Ergebnisse treten auf, wenn das alternative Verfahren und das Referenzverfahren mit unterschiedlichen primären Anreicherungen beginnen) sind verschiedene Untersuchungsproben von der gleichen Probe erforderlich. Eine Untersuchungsprobe wird mit dem alternativen Verfahren untersucht und eine andere mit dem Referenzverfahren.
- Die Daten werden in zwei Tabellen angegeben. In der ersten werden die Ergebnisse des Referenzverfahrens angeführt, in der zweiten die Ergebnisse des alternativen Verfahrens vor und nach der Bestätigung der Ergebnisse. Wenn die Ergebnisse für das alternative und das Referenzverfahren von derselben anfänglichen Anreicherungsbouillon erhalten wurden (**gepaarte** Daten), dann bestätigt die Bestätigung des Referenzverfahrens auch das alternative Verfahren. Wenn das Referenzverfahren zu einem negativen Ergebnis führt und das alternative Verfahren zu einem positiven Ergebnis, dann ist eine Bestätigung des positiven Ergebnisses erforderlich. Wenn die Ergebnisse für das alternative und das Referenzverfahren von verschiedenen Anreicherungen erhalten wurden (**ungepaarte** Daten), dann müssen alle mit dem alternativen Verfahren erhaltenen Anreicherungen zur Bestätigung weitergeführt werden.
- Das organisierende Laboratorium kann darauf hinweisen, dass Bouillons, Platten und/oder Isolate für einen bestimmten Zeitraum aufbewahrt werden müssen, damit bei Bedarf von einem Teilnehmer erhaltene Ergebnisse bestätigt werden können.
- Die Untersuchung der Proben ist von jedem Teilnehmer zum festgelegten Datum durchzuführen.
- 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) zur Verwendung in den Berechnungen für jedes Verfahren erhalten werden.

Das organisierende Laboratorium muss unter Verwendung aller aufgezeichneten Daten festlegen, welche Ergebnisse für die Verwendung in der Datenanalyse geeignet sind. Das organisierende Laboratorium muss die Rohdaten und andere im Erfassungsbogen geforderten Angaben untersuchen um sicherzustellen, dass die Teilnehmer die Untersuchungen in Übereinstimmung sowohl mit dem alternativen Verfahren als auch dem Referenzverfahren, beide in Schriftform vorliegend, durchgeführt haben. Wenn Anzeichen dafür vorliegen, dass die Ergebnisse möglicherweise unter ungeeigneten Bedingungen erhalten wurden und/oder die Verfahren nicht genauestens eingehalten wurden, werden diese oder alle Ergebnisse des Teilnehmers von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Nach Abschluss des Ringversuchs müssen alle Angaben auf den Erfassungsbögen und die Ergebnisse dem organisierenden Laboratorium vorgelegt und wie folgt untersucht werden:

- Daten der Teilnehmer sind zu verwerfen, wenn die Beförderungsbedingungen und -zeiten außerhalb der festgelegten zulässigen Toleranzen liegen (die Grenzwerte für Transportdauer und -temperatur müssen vor dem Versand der Proben festgelegt werden);
- Daten von Teilnehmern, die Proben/Testkits erhalten haben, die während des Transports beschädigt wurden, sind zu verwerfen;
- Daten von Teilnehmern, die Medienzusammensetzungen verwenden, die nicht dem (Referenz-)Verfahren entsprechen, sind zu verwerfen;
- Daten der Teilnehmer sind zu verwerfen, wenn die Angaben auf dem Erfassungsbogen nahelegen, dass das Laboratorium entweder von der Standardarbeitsanweisung oder von den entscheidenden Betriebsbedingungen abgewichen ist.

5.2.3 Berechnungen und Zusammenfassung der Daten

Die von den einzelnen Teilnehmern im Ringversuch erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 zusammengefasst:

Tabelle 7 — Positive Ergebnisse mit dem Referenzverfahren

Teilnehmer	Konzentration der Kontamination		
	L_0	L_1	L_2
Teilnehmer 1	/8	/8	/8
Teilnehmer 2	/8	/8	/8
Teilnehmer 3	/8	/8	/8
usw.	/8	/8	/8
Gesamt	P^a	P_1^b	P_2^c
^a Positive Ergebnisse mit dem Referenzverfahren bei der Konzentration 0 ^b Positive Ergebnisse mit dem Referenzverfahren bei der Konzentration 1 ^c Positive Ergebnisse mit dem Referenzverfahren bei der Konzentration 2			

Tabelle 8 — Positive Ergebnisse (vor und nach der Bestätigung) mit dem alternativen Verfahren

Teilnehmer	Konzentration der Kontamination					
	L_0		L_1		L_2	
Teilnehmer 1	/8	/8	/8	/8	/8	/8
Teilnehmer 2	/8	/8	/8	/8	/8	/8
Teilnehmer 3	/8	/8	/8	/8	/8	/8
usw.	/8	/8	/8	/8	/8	/8
Gesamt	P_0^a	CP_0^b	P_1^c	CP_1^d	P_2^e	CP_2^f
^a Positive Ergebnisse mit dem alternativen Verfahren bei der Konzentration 0. ^b Bestätigte positive Ergebnisse (nach einer zusätzlichen Bestätigung) mit dem alternativen Verfahren bei der Konzentration 0. ^c Positive Ergebnisse mit dem alternativen Verfahren bei der Konzentration 1. ^d Bestätigte positive Ergebnisse (nach einer zusätzlichen Bestätigung) mit dem alternativen Verfahren bei der Konzentration 1. ^e Positive Ergebnisse mit dem alternativen Verfahren bei der Konzentration 2. ^f Bestätigte positive Ergebnisse (nach einer zusätzlichen Bestätigung) mit dem alternativen Verfahren bei der Konzentration 2.						

Die Ergebnisse von allen Teilnehmern sind für eine **paarweise** Untersuchung in Tabelle 9 und für eine **nicht paarweise** Untersuchung in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 9 — Zusammengefasste Ergebnisse für alle Teilnehmer bei einer paarweisen Untersuchung

Ergebnis des Referenzverfahrens (einschließlich der im Rahmen des Referenzverfahrens erforderlichen Bestätigungen)	Ergebnis des alternativen Verfahrens (einschließlich der Bestätigungen, falls im Rahmen der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens gefordert)	Bestätigtes Ergebnis des alternativen Verfahrens (einschließlich aller Bestätigungen, die zum Nachweis des mutmaßlichen Ergebnisses des alternativen Verfahrens angewendet wurden)	Deskriptor der gepaarten Daten (Symbol)
+	+	Nicht notwendig ^a	Positive Übereinstimmung (PA)
+	–	Nicht notwendig ^a	Falsch negativ (FN)
–	–	Nicht notwendig ^a	Negative Übereinstimmung (NA)
–	+	–	Falsch positiv (FP)
–	+	+	Positivabweichung (PD)
^a In diesem Fall ist keine Bestätigung des Ergebnisses des alternativen Verfahrens notwendig.			

Tabelle 10 — Zusammengefasste Ergebnisse für alle Teilnehmer bei einer nicht paarweisen Untersuchung

Ergebnis des Referenzverfahrens (einschließlich der im Rahmen des Referenzverfahrens erforderlichen Bestätigungen)	Ergebnis des alternativen Verfahrens (einschließlich der Bestätigungen, falls im Rahmen der Arbeitsvorschrift des alternativen Verfahrens gefordert)	Bestätigtes Ergebnis des alternativen Verfahrens (einschließlich aller Bestätigungen, die zum Nachweis des mutmaßlichen Ergebnisses des alternativen Verfahrens angewendet wurden)	Deskriptor der ungepaarten Daten (Symbol)
+	+	+	Positive Übereinstimmung (<i>PA</i>)
+	+	–	Falsch positiv 1. Art (<i>FPI</i>)
+	–	–	Negativabweichung (<i>ND</i>)
+	–	+	Falsch negativ (<i>FN</i>)
–	–	Nicht notwendig ^a	Negative Übereinstimmung (<i>NA</i>)
–	+	–	Falsch positiv 2. Art (<i>FP2</i>)
–	+	+	Positivabweichung (<i>PD</i>)
^a In diesem Fall ist keine Bestätigung des Ergebnisses des alternativen Verfahrens notwendig.			

Für die Konzentration L_0 und für das Referenzverfahren sowie nach einer zusätzlichen Bestätigung des alternativen Verfahrens ist die prozentuale Spezifität wie folgt zu berechnen:

$$\text{Spezifität: } SP = \left(1 - \left(\frac{(C)P_0}{N_-} \right) \right) \times 100 \%$$

Dabei ist

N_- die Gesamtanzahl aller Untersuchungen von L_0 ;

$(C)P_0$ die Gesamtanzahl der falsch positiven Ergebnisse, die mit den Leerwertproben unter Anwendung des alternativen Verfahrens vor und nach einer zusätzlichen Bestätigung erhalten wurden.

Für jede der Konzentrationen L_1 und L_2 wird die Empfindlichkeit (*SE*) für das Referenzverfahren und für das alternative Verfahren unter Verwendung der Ergebnisse nach einer zusätzlichen Bestätigung wie folgt berechnet:

$$\text{Empfindlichkeit: } SE = \left(\frac{(C)P}{N_+} \right) \times 100 \%$$

Dabei ist

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

$(C)P$ die Anzahl der (zusätzlich bestätigten) positiven Ergebnisse für die Konzentrationen L_1 und L_2 für das Referenzverfahren oder für das alternative Verfahren.

ANMERKUNG Die Empfindlichkeit hängt von der Konzentration der Kontamination der Proben ab. Der Vergleich der Empfindlichkeitswerte des Referenzverfahrens und des alternativen Verfahrens kann nur innerhalb eines Ringversuchs und nicht zwischen verschiedenen Ringversuchen erfolgen.

Die relative Genauigkeit und die Empfindlichkeit des Referenzverfahrens und des alternativen Verfahrens sind auf der Grundlage der Ergebnisse der **paarweisen** Untersuchung aus Tabelle 9 wie folgt zu berechnen: