

DIN EN ISO 16140-4

ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2018-03-05

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Verfahrensvalidierung –
Teil 4: Arbeitsvorschrift für innerbetriebliche
(Einzel-)Labor-Verfahrensvalidierung (ISO/DIS 16140-4:2017);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 16140-4:2017**

Microbiology of the food chain –
Method validation –

Part 4: Protocol for single-laboratory (in-house) method validation (ISO/DIS 16140-4:2017);
German and English version prEN ISO 16140-4:2017

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Validation des méthodes –

Partie 4: Protocole pour la validation de méthodes internes dans un laboratoire
(ISO/DIS 16140-4:2017);
Version allemande et anglaise prEN ISO 16140-4:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-01-05 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm 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 nal@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 Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL),
10772 Berlin, 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 99 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)



Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 16140-4:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik — Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-01-12 AA „Validierung mikrobiologischer Verfahren“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigefügt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 6887 (alle Teile)	siehe DIN EN ISO 6887
ISO 7218	siehe DIN EN ISO 7218
ISO 16140-1:2016	siehe DIN EN ISO 16140-1:2016-11
ISO 16140-2:2016	siehe DIN EN ISO 16140-2:2016-11
ISO 4833-1	siehe DIN EN ISO 4833-1
ISO 17468	siehe DIN EN ISO 17468
ISO 22118	siehe DIN EN ISO 22118

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 4833-1, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Horizontales Verfahren zur Zählung von Mikroorganismen — Teil 1: Koloniezählung bei 30 °C mittels Gussplattenverfahren*

DIN EN ISO 6887 (alle Teile), *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen*

DIN EN ISO 7218, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen*

DIN EN ISO 16140-1:2016-11, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 1: Terminologie (ISO 16140-1:2016); Deutsche Fassung EN ISO 16140-1:2016*

DIN EN ISO 16140-2:2016-11, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens (ISO 16140-2:2016); Deutsche Fassung EN ISO 16140-2:2016*

DIN EN ISO 17468, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Technische Anforderungen und Leitfaden zur Einführung oder Überarbeitung eines genormten Referenzverfahrens*

DIN EN ISO 22118, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von pathogenen Mikroorganismen in Lebensmitteln — Leistungsmerkmale*

— Leerseite —

Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 4: Arbeitsvorschrift für innerbetriebliche (Einzel-)Labor- Verfahrensvalidierung (ISO/DIS 16140-4:2017)

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes — Partie 4 : Protocole pour la validation de méthodes internes dans un laboratoire (ISO/DIS 16140-4:2017)

Microbiology of the food chain — Method validation — Part 4: Protocol for single-laboratory (in-house) method validation (ISO/DIS 16140-4:2017)

ICS:

Deskriptoren:

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

STD Version 2.9b

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	9
2 Normative Verweisungen	9
3 Begriffe	10
4 Allgemeine Grundsätze der Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung	12
4.1 Allgemeines	12
4.2 Grundlagen des faktorischen Ansatzes	13
4.3 Grundlagen des konventionellen Ansatzes	13
5 Faktorischer Ansatz	15
5.1 Qualitative Verfahren	15
5.1.1 Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung gegenüber Referenzverfahren	15
5.1.2 Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung ohne Referenzverfahren	20
5.2 Quantitative Verfahren	22
5.2.1 Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung gegenüber Referenzverfahren	22
5.2.2 Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung ohne Referenzverfahren	25
6 Konventioneller Ansatz	27
6.1 Qualitative Verfahren	27
6.1.1 Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung gegenüber Referenzverfahren	27
6.1.2 Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung ohne Referenzverfahren	28
6.2 Quantitative Verfahren	29
6.2.1 Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung gegenüber Referenzverfahren	29
6.2.2 Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung ohne Referenzverfahren	31
Anhang A (normativ) Liste der Faktoren für das faktorische Untersuchungsdesign	34
Anhang B (informativ) Einzel-Labor-Präzisionsuntersuchung oder qualitative Verfahren	36
Anhang C (informativ) Beispiel für die Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung bei einem quantitativen Verfahren im Vergleich mit einem Referenzverfahren	38
C.1 Untersuchungsdesign	38
C.2 Berechnungen und Zusammenfassung der Daten	40
C.2.1 Genauigkeit der Prüfergebnisse	40
C.2.2 Relative Richtigkeit	41
C.2.2 Genauigkeitsprofil	42
C.2.3 Präzisionsdaten	43
Anhang D (informativ) Beispiel für die Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung bei einem qualitativen Verfahren im Vergleich mit einem Referenzverfahren	45
Anhang E (informativ) Bestimmung der Präzision bei einem instabilen Inokulum	48
E.1 Allgemeines	48
E.2 Anpassung der Messwerte bei einem linearen Trend	48
E.3 Anpassung des Messwerte anhand eines Referenzverfahrens	49
Literaturhinweise	50

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 16140-4:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 275 „Lebensmittelanalytik - Horizontale Verfahren“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 16140-4:2017 wurde von CEN als prEN ISO 16140-4:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Themen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Eine Erläuterung zum freiwilligen Charakter von Normen, der Bedeutung ISO spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen, sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT) berücksichtigt, enthält der folgende Link www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology* (Arbeitsgruppe WG 3 *Method validation*), erarbeitet.

Eine Auflistung aller Teile der Normenreihe ISO 16140 ist auf der ISO-Internetseite abrufbar.

Einleitung

Die Normenreihe ISO 16140 wurde ausgearbeitet, um auf die Anforderung zu reagieren, verschiedene Möglichkeiten zur Validierung oder Verifizierung von Prüfverfahren bereitzustellen. Sie folgt auf die Normenreihe ISO 16140:2003, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Protocol for the validation of alternative methods*. Die Normenreihe ISO 16140 besteht aus mehreren Teilen mit dem allgemeinen Titel *Microbiology of the food chain — Method validation*:

- *Part 1: Vocabulary*
- *Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method*
- *Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory*
- *Part 4: Protocol for single-laboratory (in-house) method validation*
- *Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods*
- *Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures*

ISO 17468, *Microbiology of the food chain — Technical requirements and guidance on establishment or revision of a standardized reference method* [2], ist eine Internationale Norm, die mit dieser Normenreihe eng verbunden ist. Diese Internationale Norm, die technische Regeln für die Entwicklung und Validierung von genormten Verfahren vorschreibt, dient den Technischen Komitees ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, und CEN/TC 275/WG 6, *Microbiology of the food chain*, als Grundlage für die Entwicklung von genormten Verfahren.

Bevor ein Verfahren im Labor eingesetzt werden kann, ist im Allgemeinen ein zweistufiger Prozess erforderlich:

- Die erste Stufe umfasst die Validierung des Verfahrens. Diese wird entweder in mehreren Laboren (Teile 2 und 5 von ISO 16140) oder in einem Labor (Teil 4 von ISO 16140) durchgeführt.
- Die zweite Stufe besteht aus der Verifizierung des Verfahrens. Hier wird von einem Labor gezeigt, dass es das Validierungsverfahren zufriedenstellend durchführen kann. Der Vorgang der Verfahrensverifizierung wird in Teil 3 von ISO 16140 beschrieben. In diesem Teil 3 wird unterschieden zwischen der Verifizierung von in der Validierungsuntersuchung enthaltenen (Lebensmittel-)Einheiten und in der Validierungsuntersuchung nicht untersuchten aber im Geltungsbereich der Validierung enthaltenen (Lebensmittel-)Einheiten.

ANMERKUNG 1 Bei genormten Referenzverfahren (mit und ohne veröffentlichte Validierungsdaten) ist vor der Umsetzung im Labor lediglich eine Verifizierung erforderlich.

ANMERKUNG 2 Zur Verbesserung der Lesbarkeit dieses Dokuments werden in diesem Teil der ISO 16140 die Begriffe „Kategorie“, „Art“ und „Einheit“ bisweilen mit dem Begriff „Lebensmittel“ kombiniert. Allerdings kann der Begriff „Lebensmittel“ nach den Angaben im Geltungsbereich von ISO 16140-4 hierbei durch den Begriff „Futtermittel“ und die Begriffe aus anderen Bereichen der Lebensmittelkette ausgetauscht werden.

Teil 4 von ISO 16140 befasst sich mit der Validierung in einem Labor. Die Ergebnisse gelten daher nur für das Labor, in dem die Untersuchung durchgeführt wurde. In diesem Fall ist eine Verifizierung (nach Teil 3 von ISO 16140) nicht erforderlich.

Teil 5 von ISO 16140 beschreibt die Protokolle für die Fälle, in denen eine schnellere Validierung erforderlich ist, oder in denen es um die Validierung hoch spezialisierter Verfahren geht und die Anzahl der nach ISO 16140-2 erforderlichen Laboratorien nicht erreicht werden kann.

Das Flussdiagramm in Bild 1 gibt einen Überblick über die Verknüpfungen zwischen den unterschiedlichen oben genannten Teilen. Darüber hinaus enthält er Anweisungen für Anwender zur Auswahl des richtigen Teils der Normenreihe ISO 16140. Dabei werden auch der Zweck der Untersuchung und die oben angegebenen Anmerkungen berücksichtigt. Hierzu muss auf jeden Fall zwischen den Begriffen „Referenzverfahren“ und „genormtes Referenzverfahren“ unterschieden werden. Bei einem Referenzverfahren handelt es sich um ein international anerkanntes und in hohem Maße akzeptiertes Verfahren (Begriff 2.59 aus ISO 16140-1:2016). Dagegen ist ein genormtes Referenzverfahren ein Verfahren, das in einer Norm (Begriff 3.5 aus ISO 17468:2016) beschrieben wird. In der Normenreihe ISO 16140 umfasst der Begriff „Referenzverfahren“ auch die genormten Referenzverfahren. Im Flussdiagramm wird dargestellt, dass es für einige genormte Referenzverfahren unter Umständen keine veröffentlichten Validierungsdaten gibt.

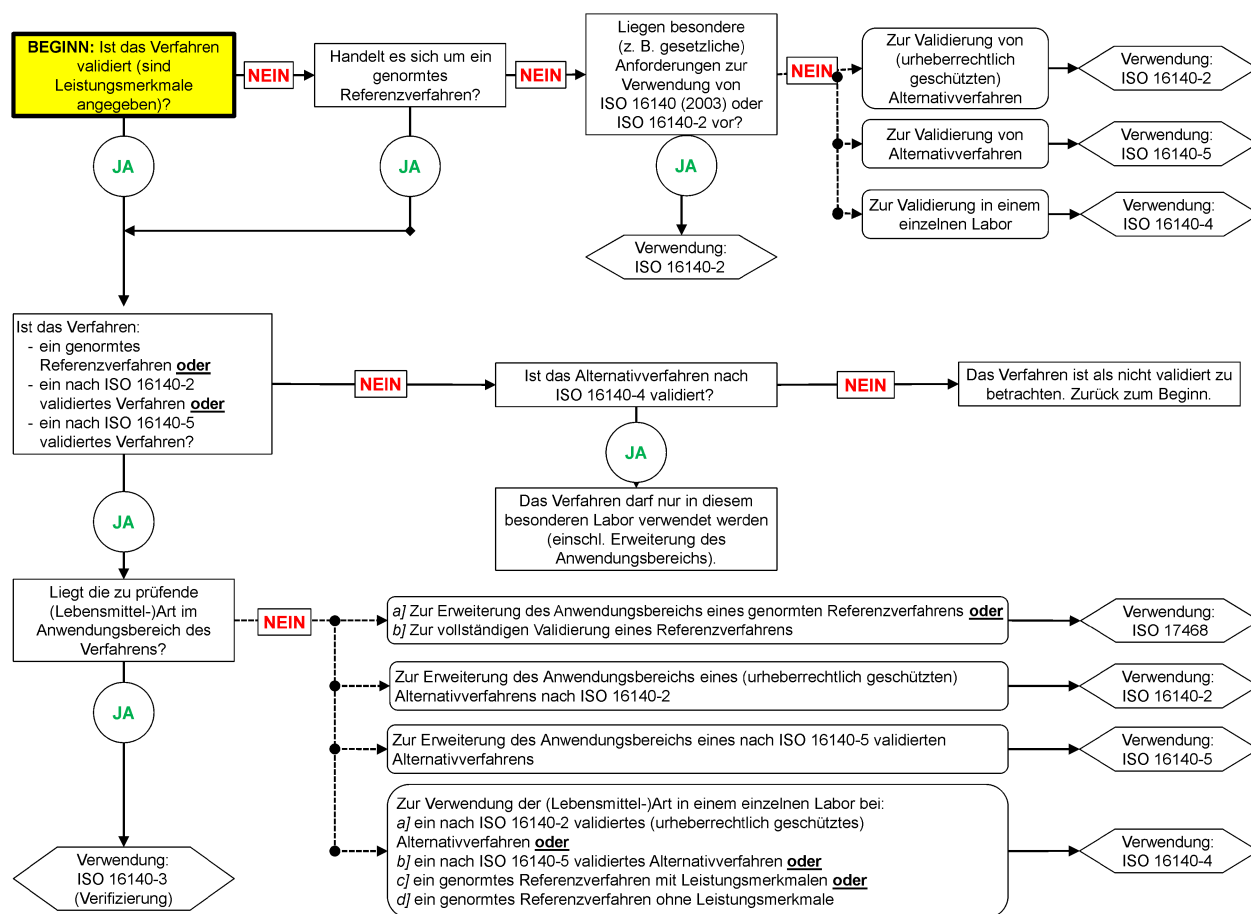


Bild 1 — Flussdiagramm zur Anwendung der verschiedenen Teile der Normenreihe ISO 16140

Teil 6 von ISO 16140 unterscheidet sich insofern ein wenig von den anderen Teilen dieser Normenreihe, als er sich auf eine sehr spezifische Situation bezieht, bei der lediglich die Bestätigungsprüfung des Verfahrens validiert wird. Bei der Bestätigungsprüfung wird ein angenommenes (mutmaßliches) Ergebnis in ein bestätigtes definitives Ergebnis umgesetzt. Die Typisierung reiner Stämme (z. B. bei der Serotypisierung von *Salmonella*) ist ebenfalls in Teil 6 von ISO 16140 enthalten.

Zur Durchführung eines Ringversuchs (einer Laborvergleichsuntersuchung) sind nach ISO 16140-2 (urheberrechtlich geschützte Verfahren) bei quantitativen Verfahren mindestens 8 Labore und bei qualitativen Verfahren mindestens 10 Labore erforderlich. ISO 16140-5 soll für Laborvergleichsuntersuchungen bestehend aus 4 bis 7 Laboren für quantitative Verfahren und aus 4 bis 9 Laboren für qualitative Verfahren

verwendet werden. ISO 16140-5 kann ausschließlich für nicht urheberrechtlich geschützte Verfahren verwendet werden. Tabelle 1 enthält eine Übersicht über die unterschiedlichen Protokolle.

Tabelle 1 — Übersicht über die unterschiedlichen in ISO 16140 beschriebenen Validierungsprotokolle

Anzahl der Labore	Mit Referenzverfahren	Ohne Referenzverfahren
1	Teil 4 von ISO 16140: faktorisches oder konventionell	Teil 4 von ISO 16140: faktorisches oder konventionell
4 bis 7 (quantitatives Verfahren)/ 4 bis 9 (qualitatives Verfahren)	Teil 5 von ISO 16140:nur für nicht urheberrechtlich geschützte Verfahren	Teil 5 von ISO 16140: nur für nicht urheberrechtlich geschützte Verfahren
≥ 8 (quantitative Verfahren)/ ≥ 10 (qualitative Verfahren)	Teil 2 von ISO 16140 (für Laborvergleichsuntersuchungen)	Nicht verfügbar

Das Ziel der in diesem Teil von ISO 16140 beschriebenen Untersuchungen für Einzel-Labor-Validierungen besteht in der Beurteilung der Leistung eines Verfahrens innerhalb eines Einzel-Labors, üblicherweise über eine Reihe von (Lebensmittel-)Kategorien und (Lebensmittel-)Arten hinweg. Die Protokolle in diesem Teil von ISO 16140 bewerten lediglich das Verfahren im betreffenden Labor. Eine Verallgemeinerung auf andere Labore zählt nicht zum Anwendungsbereich dieser Protokolle. Allerdings ist eine Ausdehnung auf andere Labore dann möglich, wenn ISO 16140-4 als erste Validierungsphase verwendet wird und danach eine Laborvergleichsuntersuchung nach ISO 17468 [2] folgt.

Ganz allgemein sind die Prinzipien und Konzepte bei Einzel-Labor-Validierungen die gleichen wie die in ISO 16140-2 zur Validierung von (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahren anhand eines Referenzverfahrens. Teil 4 kann ohne ISO 16140-2 nicht verwendet werden, da viele Definitionen und Verfahren in Teil 2 von ISO 16140 angegeben sind. Über die in ISO 16140-2 beschriebenen Validierungsparameter hinaus gibt Teil 4 von ISO 16140 die Berechnungen für die hauseigene Wiederholpräzision und die hauseigene Vergleichpräzision an. Die Berechnung dieser Parameter ist nicht erforderlich, wenn nach der Einzel-Labor-Validierung eine Laborvergleichsuntersuchung durchgeführt werden muss (wenn die Einzel-Labor-Validierung also nur die erste Phase der Validierung darstellt).

Dieser Teil von ISO 16140 enthält zwei Strategien für die Durchführung von Einzel-Labor-Verfahrensvalidierungen mit mindestens einem Stamm der Zielorganismen. Die erste Strategie basiert auf einem faktorisches Plan, bei der zweiten Strategie geht es dagegen um die Bereitstellung von Verfahrensvergleichskonzepten, die aus den Arbeitsvorschriften von ISO 16140-2 sowie aus den Arbeitsvorschriften zur Bestimmung der hauseigenen Vergleichpräzision entwickelt wurden. Die Arbeitsvorschriften behandeln qualitative und quantitative Verfahren mit und ohne Referenzverfahren.

Faktorisches Untersuchungen erfordern größere Kontrolle und mehr Planung, enthalten aber im Vergleich mit dem konventionellen Ansatz weniger Untersuchungen. Dafür bieten sie mehr Informationen über die Abweichungsquellen. Das faktorisches Untersuchungsdesign bietet mehrere Vorteile. Der faktorisches Ansatz berücksichtigt die Bedingungen eines Labors bei Routineprüfungen und bietet mehr Daten zu den Faktoren, die sich innerhalb eines Labors über die relevanten (Lebensmittel-)Matrizen hinweg ändern können (wie beispielsweise ausführendes Personal, Nährmedien usw.). Gleichzeitig werden für die Beurteilung der Leistung des Verfahrens weniger Proben benötigt. Er ermöglicht also größere Effizienz: Zum Erhalt vergleichbarer Zuverlässigkeitsniveaus sind weniger Prüfergebnisse erforderlich.

Dabei werden unterschiedliche (Lebensmittel-)Arten und ausdrücklich alle festgestellten Einflussfaktoren berücksichtigt und über ihre jeweiligen Bereiche hinweg systematisch variiert. Das Design ermöglicht die Beurteilung der Präzision quantitativer Verfahren. Es gestattet die Berechnung zuverlässiger und repräsentativer Einzel-Labor-Validierungsparameter, wie beispielsweise die hauseigene Reproduzierbarkeits-Standardabweichung oder die Werte zur LOD₅₀ oder zur RLOD, da es Daten zur Variabilität dieser

Werte unter verschiedenen Messbedingungen bereitstellt. Der Wert der Validierung wird auf diese Weise beträchtlich gesteigert.

Es ermöglicht also größere Effizienz: Zum Erhalt vergleichbarer Zuverlässigkeitsniveaus sind weniger Prüfergebnisse erforderlich.

Falls ein Referenzverfahren vorhanden ist, wird die Validierung eines Verfahrens anhand eines Vergleichs des Verfahrens mit dem Referenzverfahren durchgeführt. Dieses Vorgehen erlaubt die Einbeziehung natürlich kontaminierter Proben im Validierungsprozess und bietet damit ein realistischeres Bild der Leistung dieses Verfahrens. Ohne ein Referenzverfahren basiert der Validierungsprozess nur auf künstlich kontaminierten Proben. Teil 4 von ISO 16140 stellt Arbeitsvorschriften für beide Situationen bereit.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil von ISO 16140 bezeichnet die Arbeitsvorschriften für die Einzel-Labor-Validierung von mikrobiologischen Verfahren in der Lebensmittelkette. Die Arbeitsvorschriften in diesem Teil von ISO 16140 bewerten das Verfahren lediglich in dem Labor, in dem die Untersuchung durchgeführt wird.

Dieser Teil von ISO 16140 ist anwendbar auf die Einzel-Labor-Validierung von Verfahren zur Analyse (Nachweis oder quantitative Bestimmung) von Mikroorganismen in:

- Erzeugnissen, die für den menschlichen Verzehr vorgesehen sind,
- Erzeugnissen, die als Futtermittel vorgesehen sind,
- Umgebungsproben im Bereich der Herstellung und Handhabung von Lebensmitteln und Futtermitteln,
- Proben aus dem Bereich der Primärproduktion.

Dieser Teil von ISO 16140 gilt insbesondere für Bakterien und Pilze. Einige Abschnitte sind auf andere (Mikro-)Organismen oder deren Metaboliten anwendbar. Die Bestimmung muss im Einzelfall erfolgen.

Eine Einzel-Labor-Validierung ist dann erforderlich, wenn eine Laborvergleichsuntersuchung nach ISO 16140-2 nicht angemessen ist, beispielsweise bei hauseigenen Verfahren. Mögliche Anwendungsbereiche sind:

- Validierung eines neuen hauseigenen Verfahrens;
- Erster Schritt bei einem Validierungsprozess nach ISO 17468 [2];
- Erweiterung des Anwendungsbereichs eines nach ISO 16140-2 validierten Verfahrens, z. B. Erweiterung einer Kategorie oder Änderung der Größe einer Prüfmenge;
- Änderungen bereits bestehender Verfahren.

Im Rahmen von ISO 17468 [2] ist die Einzel-Labor-Validierung der erste Schritt bei der Normung eines Verfahrens. Sie kann nur bei solchen Verfahren angewendet werden, bei denen alle relevanten Parameter angegeben sind (einschließlich der Toleranzen zu Temperaturen und der Spezifikationen zu Nährmedien) und die bereits optimiert wurden.

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).

ISO 6887 (all parts), *Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination*

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations*

ISO 16140-1:2016, *Microbiology of the food chain — Method validation — Teil 1: Vocabulary*

ISO 16140-2:2016, *Microbiology of the food chain — Method validation — Teil 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe und Definitionen nach ISO 16140-1 sowie die Folgenden. ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

Block

mehrere eingestellte Sollwerte, die gleichzeitig oder in kurzen Zeitintervallen durchgeführt werden müssen und für die gleichen Proben verwendet werden

BEISPIEL Block = gleichzeitig durchgeführte eingestellte Sollwerte =
Techniker „a“ + Nährmedium „b“ + Temperatur „a“ + Inkubator „a“
UND
Techniker „b“ + Nährmedium „a“ + Temperatur „b“ + Inkubator „b“

3.2

Faktor

qualitativer oder quantitativer Parameter innerhalb des Verfahrens, der innerhalb der Grenzen des angegebenen Verfahrens auf mindestens zwei Ebenen variiert werden kann

BEISPIEL Techniker.

Anmerkung 1 zum Begriff: In diesem Teil von ISO 16140 werden nur die Faktoren berücksichtigt, die mit den Vorgaben des Verfahrens übereinstimmen.

3.3

Faktorniveau

Wert des Faktors innerhalb des Untersuchungsdesigns

BEISPIEL Techniker „a“, Techniker „b“ usw.

Anmerkung 1 zum Begriff: In diesem Teil von ISO 16140 wird jeder Faktor anhand von zwei Faktorniveaus, „a“ und „b“, variiert.

3.4

hausteigene Wiederholpräzision

Präzision der Messung bei einer bestimmten Kombination von Bedingungen der hausteigenen Wiederholpräzision in einem bestimmten Labor

Anmerkung 1 zum Begriff: Zu den Bedingungen der hausteigenen Wiederholpräzision zählen das gleiche Messverfahren, die gleichen Techniker, das gleiche Messsystem, die gleichen Betriebsbedingungen und Standorte sowie Parallelmessungen beim gleichen oder einem ähnlichen Objekt innerhalb eines kurzen Zeitintervalls in einem bestimmten Labor.

3.5

hausteigene Vergleichpräzision

Präzision der Messung bei einer bestimmten Kombination von Bedingungen der hausteigenen Vergleichpräzision für die Messungen in einem bestimmten Labor

Anmerkung 1 zum Begriff: Zu den Bedingungen der hausteigenen Vergleichpräzision zählen unterschiedliche Techniker, Betriebsbedingungen und Parallelmessungen beim gleichen oder einem ähnlichen Objekt über einen längeren Zeitraum in einem bestimmten Labor.

3.6

Nachweisgrenze

LOD_x

«qualitative Verfahren» gemessene Analytkonzentration, die mithilfe eines gegebenen Messverfahrens erhalten wird, für die die Nachweiswahrscheinlichkeit x beträgt

BEISPIEL LOD₅₀ ist die Nachweisgrenze, bei der 50 % der Versuche zu einem positiven Ergebnis führen.

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Begriff „Nachweisgrenze“ wird bei qualitativen Verfahren in der Mikrobiologie benutzt. Er basiert auf der Wiederholung der Untersuchungen mit drei verschiedenen Beimpfungsniveaus des Zielanalyts in einer geprüften Matrix. Die Wiederholungen werden untersucht, und die Anzahl der positiven Ergebnisse (z. B. 20 %, 70 % und 100 %) für jedes Beimpfungsniveau aufgezeichnet. Diese Daten werden für die Bestimmung der Anzahl an Zellen verwendet, die in einem verallgemeinerten linearen Modell (siehe ISO 16140-2) zu 50 % positiv sind. Dies ist von dem gewählten Verfahren für die chemischen und physikalischen Methoden abhängig, für welche die „Nachweisgrenze“ als die niedrigste Menge eines Analyts definiert ist, die in Abwesenheit dieses Analyts bei einem festgelegten Vertrauensniveau unterschieden werden kann.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.35]

3.7

Bestimmungsgrenze

LOQ

Bestimmungsgrenze

«quantitative Verfahren» geringste Analytkonzentration, die unter den Versuchsbedingungen mit einem vertretbaren Niveau an Präzision und Richtigkeit quantitativ bestimmt werden kann

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.36]

3.8

Nachweiswahrscheinlichkeit

POD

bei einem qualitativen Verfahren der Anteil von positiven Untersuchungsergebnissen für eine gegebene Matrix bei einer gegebenen Analytmenge oder -konzentration

Anmerkung 1 zum Begriff: Bei qualitativen Verfahren ist POD die Nachweiswahrscheinlichkeit.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.53, modifiziert]

3.9

relative Nachweisgrenze

RLOD

Nachweisgrenze bei $P = 0,50$ (LOD₅₀) des (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahrens geteilt durch die Nachweisgrenze bei $P = 0,50$ (LOD₅₀) des Referenzverfahrens

Anmerkung 1 zum Begriff: Zum Zweck der Annahme des alternativen Verfahrens wird die abgeleitete RLOD anhand der Zulässigkeitsgrenze auf Konformität geprüft.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.61]

3.10

Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung

hauseigene Verfahrensvalidierung

Festlegung der Leistungsmerkmale eines Verfahrens für ein bestimmtes Labor, in dem die Validierung durchgeführt wird

3.11 eingestellter Sollwert

Kombination von Faktorniveaus

BEISPIEL Techniker „a“ + Nährmedium „b“ + Temperatur „a“ + usw.

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Bedingungen können durch eine Kombination von innerhalb der Untersuchung variierten Faktorniveaus bezeichnet werden.

4 Allgemeine Grundsätze der Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung

4.1 Allgemeines

Eine Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung ist der erste Schritt im Rahmen einer allgemeinen Verfahrensvalidierung und wird benötigt, um die Leistung des Verfahrens für eine große Anzahl von (Lebensmittel-)Arten und (Lebensmittel-)Einheiten zu beurteilen. Der zweite Schritt besteht aus einer Laborvergleichsuntersuchung, mit der die Leistung des Verfahrens bei der erforderlichen Anzahl von Laboren beurteilt wird. Anhand einer Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung wird die Leistung des Verfahrens in dem Labor gezeigt, in dem die Untersuchung durchgeführt wurde. Die Ergebnisse gelten nur für dieses bestimmte Labor.

Dieser Teil von ISO 16140 bezeichnet zwei Ansätze für die Einzel-Labor-Validierung.

- Faktorischer Ansatz:
 - Leistungsmessungen nach ISO 16140-2;
 - orthogonales, faktorisches Untersuchungsdesign;
 - bessere Abdeckung eingestellter Routinesollwerte, weniger Tests als beim konventionellen Ansatz erforderlich.
- Konventioneller Ansatz:
 - Leistungsmessungen nach ISO 16140-2;
 - schrittweises Verfahren;
 - Untersuchungsdesign nach ISO 16140-2.

Validierungsverfahren hängen davon ab, ob das Verfahren qualitativ oder quantitativ ist und ob ein faktorischer oder ein konventioneller Ansatz gewählt wird. Der faktorische Ansatz für eine Einzel-Labor-Validierung kann nur bei vollständig entwickelten und optimierten Verfahren eingesetzt werden. Bei einem konventionellen Ansatz wird das Verfahren für einen bestimmten eingestellten Sollwert untersucht (also eine Gruppe spezifischer Bedingungen, unter denen das Verfahren durchgeführt wird). Die Hauptunterschiede der in diesem Dokument behandelten Ansätze für die Einzel-Labor-Validierung sind die Anzahl der unterschiedlichen (Lebensmittel-)Einheiten und die Anzahl der Prüfungen, die für die Darstellung der hinreichenden Leistung bei der Verfahrensdurchführung erforderlich sind. Bei den vorgeschlagenen Arbeitsvorschriften sind Verfahrensvalidierungen mit und ohne ein Referenzverfahren möglich.

Der Anwendungsbereich des Validierungsverfahrens muss bei Prozessbeginn bestimmt werden, z. B. zur Validierung von hauseigenen Verfahren, im ersten Schritt des Validierungsprozesses nach ISO 17468 [2], zur Erweiterung des Anwendungsbereichs eines nach ISO 16140-2 validierten Verfahrens oder zur Änderung bereits bestehender Verfahren.

Zu Verfahren mit PCR-Erkennung (Polymerase-Kettenreaktion) kann eine Beschreibung der Beurteilung der Leistungsmerkmale für einen PCR-basierten Erkennungsschritt ISO 22118 [3] entnommen werden. Es wird empfohlen, zunächst mit der Beurteilung der relevanten Leistungsparameter des PCR-Schritts (auf der Grundlage von ISO 22118 [3]) zu beginnen. Anschließend folgt eine Validierung des vollständigen Analyseverfahrens (z. B. nach ISO 16140-4), um die zuverlässige Erkennung des Zielorganismus in den getesteten Proben sicherzustellen.

Die Auswahl der in der Validierungsuntersuchung verwendeten (Lebensmittel-)Kategorien und (Lebensmittel-)Arten muss nach ISO 16140-2:2016, 5.1.3.1 erfolgen. Es wird empfohlen, dass jede für das Prüfverfahren relevante (Lebensmittel-)Kategorie in der Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung berücksichtigt wird. Anleitungen zur Auswahl der (Lebensmittel-)Kategorien und (Lebensmittel-)Arten können ISO 16140-2:2016, Anhang A, entnommen werden.

Der Anwendungsbereich der Validierung, die Ergebnisse (Tabellen und Berechnungen) der verschiedenen Teile und die Auswertung der Ergebnisse, einschließlich unstimmiger Ergebnisse, müssen in einem Validierungsbericht angeführt werden.

4.2 Grundlagen des faktorischen Ansatzes

Bei einem faktorischen Ansatz wird das Verfahren mithilfe systematisch variiertter Faktoren unter einer festgelegten Reihe von Bedingungen untersucht, die üblicherweise bei Routineanwendungen dieses Verfahrens festgestellt werden. Übliche Faktoren sind der Techniker oder die Probenlagerung, die auch innerhalb eines Labors und bei einer vorgegebenen Verfahrensanweisung variieren können. Durch die Untersuchung des Verfahrens unter einer Reihe von Bedingungen ermöglicht der faktorische Ansatz die Verallgemeinerung der Validierung auf Bedingungen, die im Labor allgemein festgestellt werden und nicht auf eine bestimmte Bedingung beschränkt sind.

Hierzu müssen vier Hauptfaktoren ausgewählt werden, die mutmaßlich für die typischen Abweichungen der Bedingungen bei Routineanwendungen des Verfahrens repräsentativ sind. Beispiele für die Faktoren werden im Anhang A gegeben.

Mit der systematischen Abweichung der Faktoren wird sichergestellt, dass die kombinierten Auswirkungen auf die allgemeinen Leistungsparameter, wie Präzision und Trennschärfe abgeleitet werden können. Dieser Punkt unterscheidet sich von einer Robustheitsuntersuchung, bei der das zentrale Ziel darin besteht, die bestimmten wesentlichen Verfahrensparameter zu erkennen und auf diese Weise die Leistung des Verfahrens zu optimieren. Die Kompatibilität zwischen den unterschiedlichen Faktorniveaus und die Auswirkungen auf die Präzision der nicht signifikanten Auswirkungen werden dabei dagegen nicht berücksichtigt.

Verglichen mit dem konventionellen Ansatz nach der Beschreibung in ISO 16140-2 erfordert der faktorische Ansatz weniger (Lebensmittel-)Einheiten und weniger Prüfungen. Gleichzeitig erlaubt er die zuverlässige Bestimmung der Validierungsparameter.

4.3 Grundlagen des konventionellen Ansatzes

Der konventionelle Ansatz entspricht im Grundsatz den Angaben in ISO 16140-2. Er erfordert mehr (Lebensmittel-)Einheiten und die Prüfung von mehr Prüfmengen als der faktorische Ansatz. Er wird in mehreren Schritten durchgeführt, eine Variation der Faktoren findet nicht statt (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 — Anzahl der erforderlichen Prüfungen für eine Verfahrensvalidierung je (Lebensmittel-) Kategorie und Verfahren für den faktorischen und den konventionellen Ansatz nach ISO 16140-4
(A = Anzahl der Prüfungen des Alternativverfahrens, R = Anzahl der Prüfungen des Referenzverfahrens)

	Faktorischer Ansatz			Konventioneller Ansatz		
Qualitatives Verfahren im Vergleich mit einem Referenzverfahren		A	R		A	R
	Faktorische Untersuchung (Trennschärfe + RLOD)	72	72	Untersuchung zur Trennschärfe	60	60
	Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität	80	0	RLOD-Untersuchung (je [Lebensmittel-]Art)	30	30
				Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität	80	0
	Gesamtzahl der Prüfungen	224		Gesamtzahl der Prüfungen	260	
Qualitatives Verfahren ohne Referenzverfahren	Faktorische Untersuchung	256		Spezifitätsuntersuchung	20	
	Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität	80		LOD ₅₀ -Untersuchung	300	
				Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität	80	
	Gesamtzahl der Prüfungen	336		Gesamtzahl der Prüfungen	400	
Quantitatives Verfahren im Vergleich mit einem Referenzverfahren		A	R		A	R
	Faktorische Untersuchung	48	48	Relative Richtigkeit	15	15
	Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität	80	0	Untersuchung zum Genauigkeitsprofil	30	30
	Gesamtzahl der Prüfungen	176		Hauseigene Vergleichpräzision	40	5
				Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität	80	0
				Gesamtzahl der Prüfungen	215	
				(ohne LOQ-Untersuchung)		
Quantitatives Verfahren ohne Referenzverfahren	Faktorische Untersuchung	48		Relative Richtigkeit	15	
	Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität	80		Untersuchung zum Genauigkeitsprofil	30	
				Hauseigene Vergleichpräzision	40	
	Gesamtzahl der Prüfungen	128		Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität	80	
				Gesamtzahl der Prüfungen	165	
				(ohne LOQ-Untersuchung)		
ANMERKUNG Die Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität erfordert 80 Kulturstämme (130 für <i>Salmonella</i>) und wird unabhängig von der Anzahl der (Lebensmittel-)Kategorien nur einmal für alle Ansätze durchgeführt.						

5 Faktorischer Ansatz

5.1 Qualitative Verfahren

5.1.1 Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung gegenüber Referenzverfahren

5.1.1.1 Allgemeine Betrachtungen

Die Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung besteht aus zwei Teilen:

- einer Untersuchung zur Exklusivität/Inklusivität des Alternativverfahrens und
- einer faktorischen, orthogonalen Vergleichsuntersuchung der Ergebnisse des Referenzverfahrens mit den Ergebnissen des Alternativverfahrens anhand von kontaminierten Proben (ein ausführliches Beispiel kann Anhang D entnommen werden).

5.1.1.2 Faktorische, orthogonale Verfahrensvergleichsuntersuchung

5.1.1.2.1 Auswahl der Proben

In einer Verfahrensvergleichsuntersuchung werden die Ergebnisse des Referenzverfahrens mit denen des Alternativverfahrens verglichen. Die Untersuchung wird unter Verwendung natürlich und/oder künstlich kontaminierter Proben durchgeführt. Hierzu müssen aus jeder (Lebensmittel-)Kategorie 12 (Lebensmittel-)Einheiten ausgewählt werden.

Die Anforderungen lauten wie folgt:

- Je (Lebensmittel-)Kategorie müssen 3 (Lebensmittel-)Arten ausgewählt werden. Je (Lebensmittel-)Art müssen 4 (Lebensmittel-)Einheiten ausgewählt werden.
- Bei der Auswahl der Proben müssen Hintergrundflora und Faktoren der Lebensmittelverarbeitung berücksichtigt werden, wie Wärme, pH-Wert, Gefrierbehandlung, Räuchern, Trocknen (niedriger a_w -Wert) und Matrixbedingungen: pH-Wert, a_w -Wert, aerobe-anaerobe Umgebungen und besondere Anforderungen an die Probenherstellung (z. B. hoher Fettgehalt oder Vorhandensein von Hemmstoffen) nach den Angaben in Normenreihe ISO 6887 („a“ = angegebenes Verdünnungsmittel, „b“ = im Labor üblicherweise verwendetes Verdünnungsmittel, sofern unterschiedlich).
- Die 4 (Lebensmittel-)Einheiten jeder (Lebensmittel-)Art werden in zufälliger Reihenfolge 4 unterschiedlichen Blöcken zugewiesen, d. h. jeder Block muss 3 (Lebensmittel-)Einheiten von 3 (Lebensmittel-)Arten enthalten.
- Sofern möglich muss für jede (Lebensmittel-)Einheit ein unterschiedlicher Stamm je Block bzw. ein anderer Belastungsfaktor verwendet werden (z. B. Temperaturabweichung, Behandlung mit Säure oder Chlor, je nach Relevanz für die (Lebensmittel-)Art).
- Jede (Lebensmittel-)Einheit muss mit mindestens drei Konzentrationsniveaus (natürlich oder künstlich) kontaminiert sein. Diese müssen mindestens sein:
 - Ein Negativkontrollenniveau L_0 ohne Zielorganismen in der Probe.
 - Ein niedriges Niveau L_1 : Das niedrige Niveau sollte mit dem Referenzverfahren eine teilweise Wiederfindung erfahren (die teilweise Wiederfindung beim niedrigen Niveau sollte zwischen 25 % und 75 % der Anzahl der geprüften Proben liegen). Idealerweise muss das niedrige Niveau nahe bei der theoretischen Erfassungsgrenze von 0,7 KBE/Prüfmenge liegen (z. B. bei 0,5 KBE bis 0,9 KBE/Prüfmenge).

- Ein hohes Niveau L_2 : ein wenig über der theoretischen Erfassungsgrenze (z. B. 1,0 KBE bis 1,5 KBE/Prüfmenge).
- Die Größe der Prüfmenge muss für jede Untersuchung genormt sein.
- Allgemeine Arbeitsvorschriften für die künstliche Kontamination von Proben können ISO 16140-2:2016, Anhang C, entnommen werden.
- Die künstliche Kontamination von Proben muss vor Beginn der Analysen abgeschlossen sein.

5.1.1.2.2 Auswahl der Verfahrensfaktoren

Die relevanten Verfahrensfaktoren, die schwer zu kontrollieren sind, wie zum Beispiel Personal, Medien und Auswahl der Inkubatoren, müssen systematisch ausgewählt und variiert werden, um die Beurteilung der Genauigkeit und Präzision im betreffenden Labor unter Routinebedingungen zu ermöglichen. Die Auswahl dieser Faktoren und Faktorniveaus ist für die Zuverlässigkeit der Untersuchungsergebnisse von entscheidender Bedeutung. Diese müssen die Abweichung im Einzel-Labor unter Routinebedingungen widerspiegeln und sollten die relevantesten Schritte des Verfahrens abdecken, wie die Herstellung und Lagerung der Proben, das Personal und die Geräte des Labors oder die Hintergrundflora. Vier relevante Faktoren müssen gleichzeitig bei jeweils 2 Niveaus variiert werden.

Bei Verfahren für kultivierbare Mikroorganismen müssen die unten dargestellten Faktoren und Faktorniveaus berücksichtigt werden. „Personal“ und „Nährmedien“ haben die größten Auswirkungen und müssen bei allen Untersuchungen wie folgt einbezogen werden:

- Die Prüfungen in Einzel-Labors müssen von 2 voneinander unabhängig arbeitenden Technikern durchgeführt werden;
- Die Prüfungen müssen mit 2 unterschiedlichen Nährmedien von 2 unterschiedlichen Herstellern oder mit Nährmedien aus 2 unterschiedlichen Chargen durchgeführt werden. Die Auswahlmöglichkeiten hängen von den üblichen Gebrauchsbedingungen der Medien im betreffenden Labor ab. So können beispielsweise Medien aus 2 unterschiedlichen Chargen verwendet werden, wenn im betreffenden Labor immer nur ein Produkt verwendet wird, auch wenn 2 Nährmedien von unterschiedlichen Herstellern erhältlich sind.

Zwei weitere Faktoren müssen ebenfalls berücksichtigt werden. Eine gruppierte Liste möglicher Faktoren kann Anhang A entnommen werden. Falls möglich, muss je ein Faktor aus jeder der relevantesten Gruppen ausgewählt werden. Die Faktoren werden gleichzeitig untersucht. Dabei wird das in 5.1.1.2.3 beschriebene Untersuchungsdesign verwendet.

Die Entscheidung für weitere am besten geeignete Faktoren für eine bestimmte Untersuchung sollte nach dem Kenntnisstand von Sachverständigen getroffen werden. Zum Beispiel: Zu jedem Verfahren werden optimale Bedingungen angegeben, z. B. Inkubationstemperatur und -dauer mit 37° C und 24 h, mit denen die besten Ergebnisse erzielt werden. Allerdings sind wegen ggf. bestehender Ungenauigkeiten der Geräte auch Bereiche um die optimalen Werte zulässig, die dennoch annehmbare Bedingungen ergeben (z. B. $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(24 \pm 1) \text{ h}$). Nach dem Untersuchungsdesign wird beabsichtigt, Untersuchungsergebnisse aus der Nutzung dieser Bereiche zuzulassen. Andere Einflüsse, wie die Atmosphäre und Belastungsbedingungen könnten ebenfalls berücksichtigt werden. Annehmbare Betriebsbedingungen für Geräte sind in ISO 7218 angegeben.

5.1.1.2.3 Prüfaufbau

Die 12 (Lebensmittel-)Einheiten werden 4 Blöcken zugewiesen (siehe Tabelle 3): Proben 1 bis 3 sind in Block 1, Proben 4 bis 6 sind in Block 2 usw. Jede (Lebensmittel-)Einheit wird mit jeder der drei Beimpfungsniveaus unter 2 unterschiedlich eingestellten Sollwerten (Kombinationen von Faktorniveaus) analysiert. Dabei ist jeder eingestellte Sollwert eine Kombination von Niveaus aus 4 Faktoren (siehe Tabelle 3), z. B.

(Lebensmittel-)Einheiten 1 bis 3 werden in eingestelltem Sollwert 1 analysiert: Techniker „a“, Hintergrundflora „b“, Nährmedium „a“ und Inkubator „a“.

Demnach sind hier je Prüfverfahren und untersuchte (Lebensmittel-)Kategorie insgesamt 12 (Lebensmittel-)Einheiten $\times$ 3 Niveaus $\times$ 2 eingestellte Sollwerte = 72 Einzelprüfungen durchzuführen. 9 Einzelprüfungen (unterschiedlicher Prüfmengen) müssen insgesamt je *eingestelltem Sollwert*, je Prüfverfahren und je untersuchter (Lebensmittel-)Kategorie durchgeführt werden.

ANMERKUNG 1 Der zweite eingestellte Sollwert jedes Blocks entspricht dem ersten, nur dass dabei alle Faktorniveaus getauscht werden. Daher stellt der zweite eingestellte Sollwert die weiteste Abweichung vom ersten eingestellten Sollwert dar.

ANMERKUNG 2 Das faktorische Design mit Blöcken ermöglicht nicht nur den Nachweis verschiedener Effekte der Faktoren sondern auch der Interaktionen zwischen den Faktoren.

ANMERKUNG 3 Zur Darstellung der Ergebnisauslegung aus dem faktorischen Design muss berücksichtigt werden, dass alle Ergebnisse im erwarteten Bereich lagen, mit Ausnahme der Ergebnisse des eingestellten Sollwerts 2 mit der Faktorniveau-Kombination „b“-„a“-„b“-„b“ und des Sollwerts 7 mit der Faktorniveau-Kombination „a“-„b“-„b“-„b“. Dies legt den Schluss nahe, dass das Nährmedium „b“ und die Inkubationsbedingung „b“ nicht zusammen passen, da diese Kombination bei beiden Sollwerten vorliegt. In diesem Fall sollte das Labor eine Ursachenanalyse durchführen, um eine Erklärung für die beobachteten Ergebnisse zu erhalten.

Tabelle 3 — Untersuchungsdesign für faktorische, orthogonale Untersuchungen mit Referenzverfahren für qualitative Verfahren bei einer (Lebensmittel-)Kategorie

[Zuweisung von 12 (Lebensmittel-)Einheiten zu 4 Blöcken, jeder mit 2 unterschiedlichen Faktorniveau-Kombinationen (eingestellten Sollwerten)]

4 (Lebensmittel-)Einheiten jeder (Lebensmittel-)Art werden in zufälliger Reihenfolge 4 unterschiedlichen Blöcken zugewiesen, d. h. jeder Block muss 3 (Lebensmittel-) Einheiten von 3 (Lebensmittel-)Arten enthalten. Dabei ist jede (Lebensmittel-)Einheit mit mindestens drei Konzentrationsniveaus künstlich kontaminiert.		Block 1: 1-3		Block 2: 4-6		Block 3: 7-9		Block 4: 10-12	
		↙ ↘		↙ ↘		↙ ↘		↙ ↘	
Eingestellter Sollwert		1	2	3	4	5	6	7	8
Faktor 1	Techniker	a	b	a	b	a	b	a	b
Faktor 2	Nährmedium	b	a	a	b	a	b	b	a
Faktor 3	z. B. Hintergrundflora (Lagerung)	a	b	a	b	b	a	b	a
Faktor 4	z. B. Inkubator	a	b	b	a	a	b	b	a
Anzahl der Prüfungen: 12 (Lebensmittel-)Einheiten $\times$ 3 Niveaus $\times$ 2 eingestellte Sollwerte $\times$ 2 Verfahren = 144 Einzelprüfungen. Die Proben werden mit drei Niveaus künstlich kontaminiert: Null, teilweise und hoch.									

Jede der drei einem Block zugewiesenen (Lebensmittel-)Einheiten sollte eine andere (Lebensmittel-)Art repräsentieren. Bild 2 vermittelt einen Überblick über das Design für Techniker „a“.

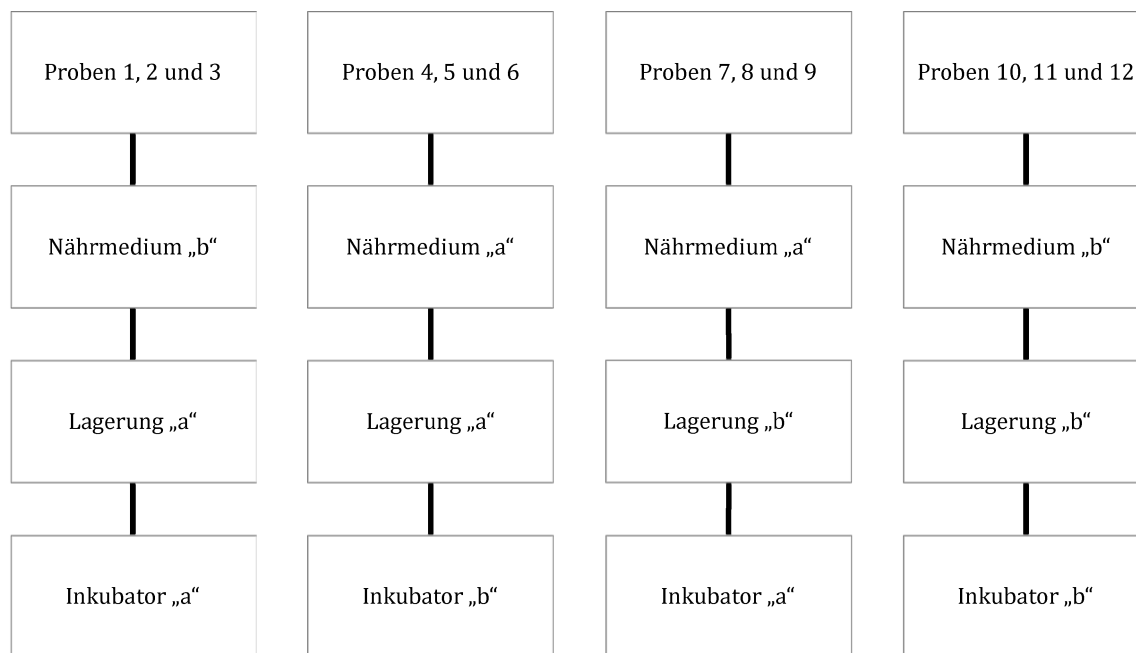


Bild 2 — Design für Techniker „a“

Die Bestätigung des (End-)Ergebnisses des Alternativverfahrens wird nach den Erläuterungen in ISO 16140-2, 5.1.3.3, benötigt, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden und die korrekt-positiven Ergebnisse zu verifizieren.

5.1.1.3 Berechnung und Auswertung hinsichtlich der Trennschärfe

Berechnungen auf der Grundlage der Ergebnisse der faktorischen Vergleichsuntersuchung müssen nach den Anleitungen in ISO 16140-2:2016, 5.1.3.4, durchgeführt werden. Für alle Berechnungen gelten folgende Vorgehensweisen:

- getrennte Durchführung für jede (Lebensmittel-)Kategorie [aller (Lebensmittel-)Arten];
- getrennte Durchführung für jede (Lebensmittel-)Art.

ANMERKUNG Um faktorische Auswirkungen feststellen zu können, können die Berechnungen auch für spezifische Faktorniveaus durchgeführt werden, z. B. für alle Ergebnisse für Nährmedium „a“ über alle (Lebensmittel-)Arten und (Lebensmittel-)Kategorien hinweg.

Die erhaltenen Ergebnisse können wie in Tabelle 4 dargestellt zusammengefasst werden.

Tabelle 4 — Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Referenz- und dem Alternativverfahren für jede (Lebensmittel-)Kategorie und jede (Lebensmittel-)Art auf der Grundlage des in Tabelle 3 dargestellten Untersuchungsdesigns

(Lebensmittel-)Kategorie	(Lebensmittel-)Arten	Positive Übereinstimmung (PA)	Negative Übereinstimmung (NA)	Negativabweichung (ND)	Positivabweichung (PD)	Falsch-positive Ergebnisse (FP)	Summe (N = NA + PA + PD + ND)	Alternativverfahren zur Trennschärfe (SE _(alt)) (%)	Referenzverfahren zur Trennschärfe (SE _(ref)) (%)	Relative Richtigkeit (RT = (PA + NA) / × 100 %)	% Falsch-positive Ergebnisse (FPR = FP / NA × 100 %)
Kategorie 1	Alle (Lebensmittel-)Arten										
Kategorie 1	(Lebensmittel-)Art A										
Kategorie 1	(Lebensmittel-)Art B										
Kategorie 1	(Lebensmittel-)Art C										
Kategorie 1	Techniker „a“ [alle (Lebensmittel-) Arten]										
Kategorie 1	Techniker „b“ [alle (Lebensmittel-) Arten]										
Kategorie 1	Nährmedium „a“ [alle (Lebensmittel-)Arten]										
Kategorie 1	Nährmedium „b“ [alle (Lebensmittel-) Arten]										
Kategorie 1	Hintergrundflora „a“ [alle (Lebensmittel-)Arten]										
Kategorie 1	Hintergrundflora „b“ [alle (Lebensmittel-)Arten]										
Kategorie 1	Inkubator „a“ [alle (Lebensmittel-) Arten]										
Kategorie 1	Inkubator „b“ [alle (Lebensmittel-) Arten]										
Kategorie 2	Alle (Lebensmittel-)Arten										
Kategorie 2	(Lebensmittel-)Art A										
Kategorie 2	(Lebensmittel-)Art B										
Kategorie 2	(Lebensmittel-)Art C										
Kategorie 2	... (unabhängig voneinander für alle Faktorniveaus)										
Kategorie x	Alle (Lebensmittel-)Arten										
Kategorie x	(Lebensmittel-)Art A										
Kategorie x	(Lebensmittel-)Art B										
Kategorie x	(Lebensmittel-)Art C										
Kategorie x	... (unabhängig voneinander für alle Faktorniveaus)										
ANMERKUNG Definitionen der Anforderungen können ISO 16140-2:2016, 5.1.3.4, entnommen werden.											

Sowohl bei paarweisen als auch nicht paarweisen Untersuchungen wird die Differenz zwischen (ND – PD) und bei paarweisen Untersuchungen die Summe von (ND + PD) berechnet. Die Definitionen von paarweisen und nicht paarweisen Untersuchungen können ISO 16140-2:2016, 5.1.2, entnommen werden. Dabei ist zu prüfen, ob die Differenz zwischen bzw. die Summe von PD und ND der in Tabelle 4 von ISO 16140-2:2016, 5.1.3.4, angegebenen Zulässigkeitsgrenze (AL) entspricht.

5.1.1.4 Berechnung und Auswertung der RLOD

Berechnungen auf der Grundlage aller Ergebnisse der faktorischen Vergleichsuntersuchung je (Lebensmittel-)Kategorie müssen nach den Anleitungen in ISO 16140-2:2016, 5.1.4.2, durchgeführt werden.

Darüber hinaus können beim faktorischen Design auf der Grundlage der berechneten RLOD-Werte jedes Faktorniveaus die Auswirkungen der einzelnen Faktoren und der Interaktionen zwischen den Faktoren (z. B. Techniker oder Nährmedium bzw. Inkubationsbedingungen) berechnet werden.

ANMERKUNG Zur Durchführung der RLOD-Berechnungen wurde ein Microsoft Excel®-basiertes Programm bereitgestellt (<http://standards.iso.org/iso/16140>).

- Spezielle gewünschte Faktoren sind wie folgt anzugeben:
- $Y^{(a)}$, der $\log_{10}$ -Wert von RLOD anhand sämtlicher Prüfergebnisse der vier eingestellten Sollwerte, bei denen der Faktor auf das Niveau „a“ gesetzt wurde, und
- $Y^{(b)}$, der $\log_{10}$ -Wert von RLOD anhand sämtlicher Prüfergebnisse der vier eingestellten Sollwerte, bei denen der Faktor auf das Niveau „b“ gesetzt wurde.
- Die Differenz dieser $\log_{10}$ -RLOD-Werte wird berechnet.

$$d = Y^{(b)} - Y^{(a)} = \log_{10}(\text{RLOD}(\text{level b})) - \log_{10}(\text{RLOD}(\text{level a})).$$

Falls diese Differenz d kleiner als $-0,3$ oder größer als $+0,3$ ist, wird der Faktor als mit erheblichem Einfluss auf RLOD betrachtet. Weitere Analysetechniken können bei Uhlig und Gowik [4] nachgeschlagen werden.

5.1.1.5 Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität

In der Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität werden sowohl Zielstämme als auch Nicht-Zielstämme mit dem Alternativverfahren geprüft. Die Untersuchung, einschließlich der Auswahl und der Anzahl der Stämme, muss nach den Angaben in ISO 16140-2:2016, 5.1.5, durchgeführt werden. Falls die Validierung eine Matrixerweiterung eines bereits validierten Verfahrens ist, so wird keine zusätzliche Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität benötigt.

5.1.2 Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung ohne Referenzverfahren

5.1.2.1 Allgemeine Betrachtungen

Ohne Referenzverfahren unterscheidet sich die Verfahrensvalidierung geringfügig von den Angaben in 5.1.1.2. Statt einer auf RLOD-Werten basierten Vergleichsuntersuchung beruhen sämtliche Berechnungen einzig auf den LOD_{50} -Werten, die jedem eingestellten Sollwert des faktorischen, orthogonalen Designs entsprechen. Die Untersuchung wird mit künstlich kontaminierten Proben durchgeführt. Das Inokulum sollte dabei auf einem nicht selektiven Medium ausgezählt werden. Die Auszählung muss nach den Angaben in ISO 7218 durchgeführt werden.

Die Ergebnisse (Tabellen und Berechnungen) der verschiedenen Teile und die Auswertung der Ergebnisse, einschließlich unstimmiger Ergebnisse, müssen in einem Validierungsbericht angeführt werden.

5.1.2.2 Faktorische, orthogonale Verfahrensuntersuchung

Hierzu müssen aus jeder (Lebensmittel-)Kategorie 16 (Lebensmittel-)Einheiten ausgewählt werden. Die Proben müssen nach den in 5.1.1.2 angegebenen Kriterien ausgewählt werden. Jede (Lebensmittel-) Einheit muss mit 3 unterschiedlichen Niveaus künstlich beimpft werden: ein „leeres“ Kontaminationsniveau, ein mittleres Kontaminationsniveau und ein hohes Kontaminationsniveau (nach ISO 16140-2:2016, 5.1.4.1). Die Prüfungen müssen parallel durchgeführt werden: je 2 Parallelproben für das „leere“ und hohe Kontaminationsniveau und 4 Parallelproben für das mittlere Kontaminationsniveau.

Jede (Lebensmittel-)Einheit wird mit zwei unterschiedlichen eingestellten Sollwerten analysiert (= Niveaukombination von 4 Faktoren). Das heißt, jede der 16 (Lebensmittel-)Einheiten wird mit 2 eingestellten Sollwerten und je 2 Parallelproben bei „leerem“ und hohem Niveau sowie 4 Parallelproben bei mittlerem Niveau analysiert. Damit werden insgesamt 256 Prüfungen durchgeführt (16 (Lebensmittel-)Einheiten × (2 + 4 + 2) Parallelproben × 2 eingestellten Sollwerten).

Im Hinblick auf die Auswahl der Faktoren ist das Untersuchungsdesign aus 5.1.1.2 zu befolgen. Tabelle 5 zeigt das Untersuchungsdesign für die faktorische, orthogonale Untersuchung ohne Referenzverfahren für qualitative Verfahren bei einer (Lebensmittel-)Kategorie.

Tabelle 5 — Untersuchungsdesign für die faktorische, orthogonale Untersuchung ohne Referenzverfahren für qualitative Verfahren bei einer (Lebensmittel-)Kategorie

16 (Lebensmittel-)Einheiten in vier Blöcken von mindestens 3 (Lebensmittel-)Arten aus 1 (Lebensmittel-)Kategorie in zufälliger Reihenfolge, zumindest aber 3 (Lebensmittel-)Arten je Block und jede (Lebensmittel-)Einheit mit 3 Niveaus künstlich kontaminiert		1–4		5–8		9–12		13–16	
		↙ ↘		↙ ↘		↙ ↘		↙ ↘	
eingestellter Sollwert		1	2	3	4	5	6	7	8
Faktor 1	Techniker	a	b	a	b	a	b	a	b
Faktor 2	Nährmedium	b	a	a	b	a	b	b	a
Faktor 3	z. B. Hintergrundflora (Lagerung)	a	b	a	b	b	a	b	a
Faktor 4	z. B. Inkubator	a	b	b	a	a	b	b	a
Anzahl der Prüfungen: 16 (Lebensmittel-)Einheiten × (2+4+2)* Parallelproben × 2 eingestellten Sollwerten = 256 Prüfungen. Die Proben werden künstlich kontaminiert.									
*2 Parallelproben auf niedrigem Niveau + 4 Parallelproben auf mittlerem (teilweisem) Niveau + 2 Parallelproben auf hohem Niveau.									

Die Auswahl von Stämmen muss in Abhängigkeit von der zu prüfenden Matrix erfolgen. Die Anzahl der in diesem Untersuchungsdesign verwendeten Stämme hängt von der Anzahl der Matrizen, der Verfügbarkeit der Stämme und dem Anwendungsbereich ab.

Die Validierung muss mithilfe von 4 Stämmen durchgeführt werden. Dabei wird jeder Stamm 1 Block des Designs zugewiesen (also entweder den Proben 1–4, 5–8, 9–12 oder 13–16). Dies gilt nicht, wenn weniger als 4 Stämme zur Verfügung stehen. Die Stämme müssen so ausgewählt werden, dass die Abweichungen innerhalb der Spezies wiedergegeben werden. Falls 3 Stämme verfügbar sind, wird 1 davon 2 Blöcken des Designs zugewiesen. Falls nur 2 Stämme vorhanden sind, wird jeder Stamm in 2 Blöcken verwendet. Falls nur ein Stamm relevant ist oder bereitsteht, muss dieser Stamm im Validierungsbericht vollständig charakterisiert werden. Das Verfahren ist dann nur für diesen speziellen Stamm validiert. Wenn Stämme

stark matrixspezifisch sind, können die Proben so auf die 4 Blöcke aufgeteilt werden, dass jeder Block ähnliche Matrizen umfasst.

5.1.2.3 Berechnung von LOD_{50}

Beim faktorischen Design kann der LOD_{50} -Wert für jeden eingestellten Sollwert mithilfe eines aus ISO 16140-2 übernommenen und angepassten komplementären log-log-Ansatzes berechnet werden. Einzelheiten zur Berechnung des LOD_{50} -Werts sind in ISO 16140-4, Anhang B, angegeben.

ANMERKUNG Zur Durchführung der LOD_{50} -Berechnungen wurde ein Microsoft Excel®-basiertes Programm bereitgestellt (<http://standards.iso.org/iso/16140>).

Darüber hinaus können beim faktorischen Design auf der Grundlage der berechneten LOD_{50} -Werte jedes Faktorniveaus die Auswirkungen der einzelnen Faktoren und der Interaktionen zwischen den Faktoren (z. B. Techniker oder Nährmedium bzw. Inkubationsbedingungen) berechnet werden. Spezielle gewünschte Faktoren sind wie folgt anzugeben:

- $Y^{(a)}$, der $\log_{10}$ -Wert von LOD_{50} anhand sämtlicher Prüfergebnisse der vier eingestellten Sollwerte, bei denen der Faktor auf das Niveau „a“ gesetzt wurde, und
- $Y^{(b)}$, der $\log_{10}$ -Wert von LOD_{50} anhand sämtlicher Prüfergebnisse der vier eingestellten Sollwerte, bei denen der Faktor auf das Niveau „b“ gesetzt wurde.

Die Differenz dieser $\log_{10}$ - LOD_{50} -Werte wird berechnet.

$$d = Y^{(b)} - Y^{(a)}$$

Falls diese Differenz d kleiner als $-0,3$ oder größer als $+0,3$ ist, wird der Faktor als mit erheblichem Einfluss auf LOD_{50} betrachtet.

5.1.2.4 Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität

In der Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität werden sowohl Zielstämme als auch Nicht-Zielstämme mit dem Alternativverfahren geprüft. Die Untersuchung, einschließlich der Auswahl und der Anzahl der Stämme, muss nach den Angaben in ISO 16140-2:2016, 5.1.5, durchgeführt werden. Falls die Validierung eine Matrixerweiterung eines bereits validierten Verfahrens ist, so wird keine zusätzliche Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität benötigt.

5.2 Quantitative Verfahren

5.2.1 Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung gegenüber Referenzverfahren

5.2.1.1 Allgemeine Betrachtungen

Die Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung besteht aus zwei Teilen:

- einer Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität des Alternativverfahrens (siehe ISO 16140-2:2016, 6.1.5),
- einer faktorischen, orthogonalen Vergleichsuntersuchung der Ergebnisse des Referenzverfahrens mit den Ergebnissen des Alternativverfahrens anhand von kontaminierten Proben (ein ausführliches Beispiel kann Anhang C entnommen werden).

5.2.1.2 Auswahl der Stichproben

In einer Verfahrensvergleichsuntersuchung werden die Ergebnisse des Referenzverfahrens mit denen des Alternativverfahrens verglichen. Die Untersuchung wird unter Verwendung wie folgt ausgewählter, natürlich und/oder künstlich kontaminierter Proben durchgeführt.

- 12 (Lebensmittel-)Einheiten aus mindestens 3 (Lebensmittel-)Arten müssen ausgewählt werden. Je (Lebensmittel-)Art müssen mindestens 3 (Lebensmittel-)Einheiten ausgewählt werden.
- Bei der Auswahl müssen die Hintergrundflora und Faktoren der Lebensmittelverarbeitung berücksichtigt werden, wie Wärme, pH-Wert, Gefrierbehandlung, Räuchern, Trocknen (niedriger a_w -Wert) und Matrixbedingungen: pH-Wert, a_w -Wert, aerobe-anaerobe Umgebung und Reanimation.
- Die Größe der Prüfmenge muss für jede Untersuchung genormt sein.
- (Lebensmittel-)Einheiten können natürlich oder künstlich kontaminiert werden. Sofern möglich, muss bei künstlicher Kontamination für jede (Lebensmittel-)Einheit ein unterschiedlicher Stamm und/oder andere Hintergrundflora bzw. ein anderer Belastungsfaktor verwendet werden, z. B. Temperaturabweichung, Behandlung mit Säure oder Chlor, je nach Relevanz für die (Lebensmittel-)Art.
- Die 12 (Lebensmittel-)Einheiten müssen (auf künstlichem oder natürlichem Weg) auf 3 Niveaus kontaminiert werden: Es müssen 4 Lebensmittel-)Einheiten mit niedrigem Kontaminationsniveau L_1 ausgewählt und mit den Nummern 1, 4, 7 und 10 bezeichnet werden. 4 weitere (Lebensmittel-)Einheiten müssen eine mittlere Kontamination L_2 aufweisen (Nrn. 2, 5, 8 und 11) und 4 weitere eine hohe Konzentration L_3 (Nrn. 3, 6, 9 und 12). Siehe Tabelle 4.
- Allgemeine Arbeitsvorschriften für die künstliche Kontamination von Proben können ISO 16140-2:2016, Anhang C, entnommen werden.

5.2.1.3 Auswahl der Verfahrensfaktoren

Die Auswahl der Verfahrensfaktoren muss nach den Angaben in 5.1.1.2.2 durchgeführt werden. Die Faktoren werden gleichzeitig untersucht. Dabei wird das in 5.2.1.4 beschriebene Untersuchungsdesign verwendet.

5.2.1.4 Prüfaufbau

- Für jedes Auszählverfahren und jede (Lebensmittel-)Kategorie gilt: 12 (Lebensmittel-)Einheiten (4 auf niedrigem, 4 auf mittlerem und 4 auf hohem Konzentrationsniveau) müssen mit 2 eingestellten Sollwerten analysiert werden. Für jeden eingestellten Sollwert müssen zwei Parallelproben durchgeführt werden. Daher müssen 12 (Lebensmittel-)Einheiten $\times$ 2 eingestellte Sollwerte $\times$ 2 Parallelproben = 48 Einzelprüfungen durchgeführt werden. Insgesamt ergibt dies 96 Einzelprüfungen (48 für das Referenzverfahren und 48 für das Alternativverfahren).
- Jeder eingestellte Sollwert ist eine Kombination der Niveaus von 4 Verfahrensfaktoren. Dabei müssen 8 unterschiedliche Sollwerte (1–8) berücksichtigt werden.

Tabelle 6 zeigt die Zuordnung von Proben zu den Sollwerten der Niveaukombinationen für die Verfahrensfaktoren.

Tabelle 6 — Untersuchungsdesign für die faktorische, orthogonale Vergleichsuntersuchung bei quantitativen Verfahren

12 (Lebensmittel-) Einheiten aus mindestens 3 (Lebensmittel-)Arten je (Lebensmittel-)Kategorie, Auswahl in zufälliger Reihenfolge	4 (Lebensmittel-)Einheiten mit niedrigem Niveau	1	4	7	10				
	4 (Lebensmittel-)Einheiten mit mittlerem Niveau	2	5	8	11				
	4 (Lebensmittel-)Einheiten mit hohem Niveau	3	6	9	12				
									
eingestellter Sollwert		1	2	3	4	5	6	7	8
Faktor 1	Techniker	a	b	a	b	a	b	a	b
Faktor 2	Nährmedium	b	a	a	b	a	b	b	a
Faktor 3	z. B. Inkubationsdauer	a	b	a	b	b	a	b	a
Faktor 4	z. B. Zeit der Wertermittlung	a	b	b	a	a	b	b	a
Anzahl der Prüfungen: 12 Proben × 2 eingestellte Sollwerte × 2 Parallelproben × 2 Verfahren = 96 Prüfungen. Die Proben werden auf natürlichem oder künstlichem Weg kontaminiert.									

Die Bestätigung der Einzelprüfungen muss nach den Angaben in ISO 16140-2 durchgeführt werden.

5.2.1.5 Relative Richtigkeit

Die Berechnung und Auswertung der relativen Richtigkeit muss nach den Angaben in ISO 16140-2:2016, 6.1.2.3, durchgeführt werden. Die 4 Prüfergebnisse der Auszählungen jeder Probe sind wie 4 Parallelproben zu behandeln. Dies ergibt die durchschnittliche relative Richtigkeit über alle eingestellten Sollwerte.

Darüber hinaus wird die relative Richtigkeit jeder der folgenden 8 Untermengen aus den folgenden eingestellten Sollwerten separat analysiert: Techniker „a“ (Sollwerte 1, 3, 5 und 7), Techniker „b“ (Sollwerte 2, 4, 6 und 8), Nährmedium „a“ (Sollwerte 2, 3, 5 und 8), Nährmedium „b“ (Sollwerte 1, 4, 6 und 7), Inkubationszeit „a“ (Sollwerte 1, 3, 6 und 8), Inkubationszeit „b“ (Sollwerte 2, 4, 5 und 7), sofortige Wertermittlung „a“ (Sollwerte 1, 4, 5 und 8), verzögerte Wertermittlung „b“ (Sollwerte 2, 3, 6 und 7).

Anschließend werden die Differenzen der Abweichung 1. zwischen den beiden Technikern, 2. zwischen den beiden Nährmedien, 3. Zwischen den beiden Inkubationsdauern und 4. Zwischen der sofortigen und der verzögerten Wertermittlung berechnet.

ANMERKUNG Weitere Prüfungen können durchgeführt werden, wenn bestimmte Faktorkombinationen unerwartete Werte ergeben. Das faktorische Design ermöglicht noch weitere Nachforschungen bei den Leistungsparametern, wenn bei einem bestimmten Nährmedium in Kombination mit einem spezifischen Inkubationssollwert besonders auffällige Ergebnisse erhalten werden.

5.2.1.6 Genauigkeitsprofil

Die Berechnung und Auswertung des Genauigkeitsprofils muss nach den Angaben in ISO 16140-2:2016, 6.1.3.3, durchgeführt werden. Die 4 Prüfergebnisse (2 eingestellte Sollwerte × 2 Parallelproben) der Auszählungen jeder Probe sind wie 4 Parallelproben zu behandeln.

ANMERKUNG Weitere Beurteilungen des Genauigkeitsprofils können sich aus einer Analyse der faktorischen Auswirkungen ergeben.

5.2.1.7 Hauseigene Wiederholpräzision und hauseigene Vergleichpräzision

Die folgende Notation werden verwendet: i bezeichnet das Niveau ($1 \leq i \leq 3$), j bezeichnet den eingestellten Sollwert ($1 \leq j \leq 8$), k bezeichnet die Parallelprobe ($1 \leq k \leq 2$). Die Daten werden wie folgt bezeichnet:

- y_{ijk} ist das auf $\log_{10}$ umgewandelte Prüfergebnis für Niveau i , den eingestellten Sollwert j und die Parallelprobe k nach dem Alternativverfahren;
- y_{p1} und y_{p2} sind die beiden Mittelwerte der paarweisen Werte y , wobei p die betreffende Probe p (mit $1 \leq p \leq 12$, also „A“ bis „L“) der beiden entsprechenden eingestellten Sollwerte angibt.

Die hauseigene Wiederholbarkeits-Standardabweichung über alle (Lebensmittel-)Arten wird wie folgt berechnet:

$$s_{r,inhouse} = \sqrt{\frac{1}{48} \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^8 (y_{ij1} - y_{ij2})^2}$$

Die hauseigene Vergleichstandardabweichung über alle (Lebensmittel-)Arten wird wie folgt berechnet:

$$s_{R,inhouse} = \sqrt{s_{L,inhouse}^2 + s_{r,inhouse}^2}$$

Dabei ist

$$s_{L,inhouse} = \sqrt{\frac{1}{24} \sum_{p=1}^{12} (y_{p1} - y_{p2})^2 - \frac{1}{2} s_{r,inhouse}^2}$$

Wenn die Gleichung zur Berechnung der Quadratwurzel einer negativen Zahl führt, so lautet das Ergebnis = 0.

ANMERKUNG Statistische effizientere Berechnungen können durch Einsatz der Schätzungen zur eingeschränkten maximalen Wahrscheinlichkeit (en: restricted maximum likelihood, REML) [5] erhalten werden.

5.2.1.8 Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität

In der Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität werden sowohl Zielstämme als auch Nicht-Zielstämme mit dem Alternativverfahren geprüft. Die Untersuchung, einschließlich der Auswahl und der Anzahl der Stämme, muss nach den Angaben in ISO 16140-2:2016, 6.1.5, durchgeführt werden. Falls die Validierung eine Matrixerweiterung eines bereits validierten Verfahrens ist, so wird keine zusätzliche Untersuchung zur Inklusivität/Exklusivität benötigt.

Sie ist bei Zählverfahren erforderlich, die dafür ausgelegt sind, spezifische Mikroorganismen nachzuweisen. Sie ist nicht erforderlich bei allgemeinen Zählverfahren, wie z. B. Bestimmung der Gesamtkeimzahl (auf Platten) (en: total plate count, TPC) und Verfahren für Hefe & Schimmelpilze (en: yeast & mould, Y&M).

5.2.2 Untersuchung zur Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung ohne Referenzverfahren

5.2.2.1 Allgemeine Betrachtungen

Es gelten die allgemeinen Betrachtungen aus 5.2.1.1. Ohne ein Referenzverfahren müssen die Ergebnisse des Alternativverfahrens allerdings mit bekannten Kontaminationsniveaus aus einer künstlichen Beimpfung der Proben verglichen werden.

5.2.2.2 Auswahl der Proben

Die Proben müssen nach den Angaben in 5.2.1.2 ausgewählt werden.

5.2.2.3 Auswahl der Verfahrensfaktoren

Die Verfahrensfaktoren müssen nach den Angaben in 5.2.1.3 ausgewählt werden.

5.2.2.4 Prüfaufbau

Die (Lebensmittel-)Einheiten müssen künstlich auf 3 Niveaus kontaminiert werden: ein niedriges Niveau L_1 , ein mittleres Niveau L_2 und ein hohes Niveau L_3 . Relative Konzentrationsniveaus müssen anhand unterschiedlicher Verdünnungsniveaus des Inokulums (z. B. 1:10:100) erreicht werden. Der Versuchsaufbau aus 5.2.1.4 wird hierfür verwendet: 4 (Lebensmittel-)Einheiten je Kontaminationsniveau werden in je 2 Parallelproben mit 2 eingestellten Sollwerten analysiert. Die Zuweisungen der 12 unterschiedlichen (Lebensmittel-)Einheiten zu den 8 eingestellten Sollwerten in 4 Blöcken sind in Tabelle 7 angegeben. Das bedeutet, dass 8 eingestellte Sollwerte mit je 3 Niveaus und 2 Parallelproben geprüft werden, was insgesamt 48 Einzelprüfungen ergibt.

ANMERKUNG Bei einigen Verfahren ist die Nutzung der gleichen Probengruppen A, B, ... usw. für alle Kontaminationsniveaus des gleichen eingestellten Sollwerts unter Umständen besser geeignet. Dies kann durch die Verwendung von nur 4 Probengruppen erreicht werden, die den eingestellten Sollwerten nach den Angaben in Tabelle 5 zugeordnet werden.

Tabelle 7 — Untersuchungsdesign für die faktorische, orthogonale Vergleichsuntersuchung bei quantitativen Verfahren

12 (Lebensmittel-) Einheiten aus 3 (Lebensmittel-)Arten je (Lebensmittel-)Kategorie, Auswahl in zufälliger Reihenfolge	gering	1	4	7	10				
	mittel	2	5	8	11				
	hoch	3	6	9	12				
									
eingestellter Sollwert		1	2	3	4	5	6	7	8
Faktor 1	Techniker	a	b	a	b	a	b	a	b
Faktor 2	Nährmedium	b	a	a	b	a	b	b	a
Faktor 3	z. B. Inkubationsdauer	a	b	a	b	b	a	b	a
Faktor 4	z. B. Zeit der Wertermittlung	a	b	b	a	a	b	b	a
Anzahl der Prüfungen: 12 (Lebensmittel-)Einheiten × 2 eingestellte Sollwerte × 2 Parallelproben = 48 Einzelprüfungen. Die (Lebensmittel-)Einheiten werden künstlich kontaminiert.									

5.2.2.5 Relative Richtigkeit

Die Berechnung und Auswertung der relativen Richtigkeit beruht auf der Arbeitsvorschrift aus 5.2.1.5, einschließlich der Berechnung der relativen Richtigkeit für die 8 beschriebenen Datenuntermengen. Diese Arbeitsvorschrift wird insofern geändert, als statt der Prüfergebnisse des Referenzverfahrens die bekannten künstlichen Kontaminationsniveaus verwendet werden.