

DIN EN ISO 16140-7



ICS 07.100.30

Einsprüche bis 2023-06-21

Entwurf

**Mikrobiologie der Lebensmittelkette –
Verfahrensvalidierung –
Teil 7: Arbeitsvorschrift für die Validierung von
Identifizierungsverfahren von Mikroorganismen (ISO/DIS 16140-7:2023);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 16140-7:2023**

Microbiology of the food chain –
Method validation –
Part 7: Protocol for the validation of identification methods of microorganisms
(ISO/DIS 16140-7:2023);
German and English version prEN ISO 16140-7:2023

Microbiologie de la chaîne alimentaire –
Validation des méthodes –
Partie 7: Titre manque (ISO/DIS 16140-7:2023);
Version allemande et anglaise prEN ISO 16140-7:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-04-21 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 oder Am DIN-Platz, 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 93 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 16140-7:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium 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 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

ISO 4833-1	siehe	DIN EN ISO 4833-1
ISO 11133	siehe	DIN EN ISO 11133
ISO 16140-1:2016	siehe	DIN EN ISO 16140-1:2016-11
ISO 16140-2	siehe	DIN EN ISO 16140-2
ISO 16140-3	siehe	DIN EN ISO 16140-3
ISO 16140-4	siehe	DIN EN ISO 16140-4
ISO 16140-5	siehe	DIN EN ISO 16140-5
ISO 16140-6	siehe	DIN EN ISO 16140-6
ISO/DIS 17468	siehe	DIN EN ISO 17468*
ISO 23418	siehe	DIN EN ISO 23418

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

* Zur Zeit Entwurf.

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 11133, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

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, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens*

DIN EN ISO 16140-3, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 3: Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz- und validierten alternativen Verfahren in einem Einzel-Labor*

DIN EN ISO 16140-4, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 4: Arbeitsvorschrift für Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung*

DIN EN ISO 16140-5, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 5: Arbeitsvorschrift für eine faktorielle Ringversuch-Verfahrensvalidierung nicht urheberrechtlich geschützter Verfahren*

DIN EN ISO 16140-6, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 6: Arbeitsvorschrift für die Validierung von (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung*

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

DIN EN ISO 23418, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Gesamtgenomsequenzierung zur Typisierung und genomischen Charakterisierung von Bakterien — Allgemeine Anforderungen und Leitfaden*

— Leerseite —

<i>Titel de:</i>	Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung — Teil 7: Arbeitsvorschrift für die Validierung von Identifizierungsverfahren von Mikroorganismen (ISO/DIS 16140-7:2023)
<i>Titel en:</i>	Microbiology of the food chain — Method validation — Part 7: Protocol for the validation of identification methods of microorganisms (ISO/DIS 16140-7:2023)
<i>Titel fr:</i>	Microbiologie de la chaîne alimentaire — Validation des méthodes — Partie 7: Titre manque (ISO/DIS 16140-7:2023)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	10
2 Normative Verweisungen	10
3 Begriffe	10
4 Allgemeine Grundsätze für die Validierung von Identifizierungsverfahren für Mikroorganismen	14
5 Stämme	14
6 Leistungsmerkmale eines Identifizierungsverfahrens	14
6.1 Allgemeines	14
6.2 Beschreibung des Konzepts und der Beschränkungen des Identifizierungsverfahrens	15
6.3 Identifizierungsgenauigkeit des Identifizierungsverfahrens	15
6.3.1 Anzahl der Stämme, auf die zu prüfen ist	15
6.3.2 Auswahl der Stämme	17
6.3.3 Untersuchung der Stämme	17
6.3.4 Angabe und Auswertung der Ergebnisse	18
6.4 Bewertung	19
7 Ringversuch	21
7.1 Allgemeines	21
7.2 Zu erfassende Datensätze	21
7.3 Arbeitsvorschrift	21
7.4 Angabe der Ergebnisse	22
7.5 Auswertung und Bewertung	23
Anhang A (informativ) Leitlinien für die Validierung von Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen in Ökosystemen	25
A.1 Allgemeines	25
A.2 Leistungsmerkmale eines Identifizierungsverfahrens	25
A.2.1 Allgemeines	25
A.2.2 Beschreibung des Konzepts und der Beschränkungen des Identifizierungsverfahrens	25
A.2.3 Nachweisgrenze (LOD ₅₀) des Identifizierungsverfahrens	26
A.2.4 Untersuchung des Risikos der Nichtidentifizierung von Arten	29
A.3 Ringversuch	30
A.3.1 Allgemeines	30
A.3.2 Arbeitsvorschrift	30
A.3.3 Angabe und Auswertung der Ergebnisse	31
Anhang B (normativ) Bei der Auswahl von Stämmen für eine Identifizierungsgenauigkeitsuntersuchung zu berücksichtigende Aspekte	34
B.1 Allgemeines	34
B.2 Kategorien von Identifizierungsgruppen	34
B.3 Auswahl der Gruppe	34
Anhang C (informativ) Angabe, Auswertung und Bewertung der Ergebnisse	35

C.1	Allgemeines	35
C.2	Beispiel für die Validierung eines Identifizierungsverfahrens für eine undefinierte Gruppe von Mikroorganismen unter Verwendung nicht-selektiver Agarmedien	35
C.3	Beispiel für die Validierung eines Identifizierungsverfahrens für eine definierte Gruppe von Mikroorganismen unter Verwendung nicht-selektiver Agarmedien	39
Anhang D (informativ) Veranschaulichungen der Validierung von Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen in Ökosystemen.....		42
D.1	Allgemeines	42
D.2	Beispiel für eine LOD ₅₀ -Untersuchung	42
D.3	Beispiel für die Untersuchung des Risikos der Nichtidentifizierung.....	44
D.4	Beispiel für einen Ringversuch	46
Literaturhinweise.....		49

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 16140-7:2023) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34 „Food products“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 463 „Mikrobiologie der Lebensmittelkette“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 16140-7:2023 wurde von CEN als prEN ISO 16140-7:2023 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (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 Normungsthemen 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-Directives, 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-Directives, 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.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 34, *Food products*, Unterkomitee SC 9, *Microbiology*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 463, *Mikrobiologie der Lebensmittelkette*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

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

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

0.1 Die Normenreihe ISO 16140

Die Normenreihe ISO 16140 wurde in Reaktion auf den Bedarf an verschiedenen Arten der Validierung oder Verifizierung von Prüfverfahren erweitert. Sie ist die Nachfolgerin von ISO 16140:2003. Die Normenreihe ISO 16140 besteht unter dem allgemeinen Titel *Mikrobiologie der Lebensmittelkette — Verfahrensvalidierung* aus mehreren Teilen:

- Teil 1: Terminologie
- Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens
- Teil 3: Arbeitsvorschrift für die Verifizierung von Referenz- und validierten alternativen Verfahren in einem Einzel-Labor
- Teil 4: Arbeitsvorschrift für Einzel-Labor-Verfahrensvalidierung
- Teil 5: Arbeitsvorschrift für eine faktorielle Ringversuch-Verfahrensvalidierung nicht urheberrechtlich geschützter Verfahren
- Teil 6: Arbeitsvorschrift für die Validierung von (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung
- Teil 7: Arbeitsvorschrift für die Validierung von Identifizierungsverfahren von Mikroorganismen

Eine damit in engem Zusammenhang stehende Internationale Norm, die technische Regeln für die Entwicklung und Validierung von genormten Verfahren festlegt, ist ISO 17468.

Im Allgemeinen sind zwei Stufen nötig, bevor ein Verfahren im Labor angewendet werden kann.

- Die erste Stufe ist die Validierung des Verfahrens. Die Validierung erfolgt durch einen Versuch in einem Einzel-Labor und einen nachfolgenden Ringversuch (siehe ISO 16140-2, ISO 16140-5, ISO 16140-6 und die Beschreibung in diesem Dokument). Im Falle der Validierung eines Verfahrens in einem Einzel-Labor (siehe ISO 16140-4) wird kein Ringversuch durchgeführt.
- Die zweite Stufe ist die Verifizierung des Verfahrens, bei der ein Labor nachweist, dass es ein validiertes Verfahren zufriedenstellend ausführen kann. Dies wird in ISO 16140-3 beschrieben. Die Verifizierung ist ausschließlich bei Verfahren anwendbar, die durch einen Ringversuch validiert wurden.

Im Allgemeinen werden zwei Arten von Verfahren unterschieden: Referenzverfahren und alternative Verfahren.

Ein Referenzverfahren wird in ISO 16140-1:2016, 2.59, definiert als ein „international anerkanntes und in hohem Maße akzeptiertes Verfahren“. In der Anmerkung zum Begriff wird erläutert, dass dies „ISO-Normen und Normen, welche gemeinsam durch ISO und CEN veröffentlicht wurden oder andere regionale/nationale Normen von gleichwertigem Rang“ sind.

In der Normenreihe ISO 16140 umfassen Referenzverfahren (von der ISO bzw. dem CEN) genormte Referenzverfahren, die in ISO/DIS 17468, 3.5, als „in einer Norm beschriebenes Referenzverfahren“ definiert werden.

Ein alternatives Verfahren (zur Validierung vorgelegtes Verfahren) ist in ISO 16140-1:2016, 2.4, definiert als ein „Untersuchungsverfahren, das bei einer bestimmten Kategorie von Produkten den gleichen Analyt nachweist oder quantitativ bestimmt, der mit dem entsprechenden Referenzverfahren bestimmt wird“. In der Anmerkung zum Begriff wird klargestellt: „Das Verfahren kann urheberrechtlich geschützt sein. Die

Verwendung des Begriffs ‚alternativ‘ bezieht sich auf das gesamte ‚System von Prüfverfahren und Reaktion‘. Der Begriff schließt alle materiellen oder sonstigen Bestandteile, die zur Durchführung des Verfahrens erforderlich sind, ein.“

ISO 16140-4 behandelt die Validierung in einem Einzel-Labor. Die Ergebnisse sind daher nur für das Labor gültig, das die Untersuchung vorgenommen hat. In diesem Fall ist die (in ISO 16140-3 beschriebene) Verifizierung nicht anwendbar. ISO 16140-5 beschreibt Protokolle für nicht urheberrechtlich geschützte Verfahren, bei denen eine schnellere Validierung erforderlich ist, oder für den Fall, dass das validierende Verfahren hochgradig spezialisiert ist und die in ISO 16140-2 geforderte Anzahl der teilnehmenden Labore nicht erreicht werden kann. ISO 16140-4 und ISO 16140-5 können für die Validierung anhand eines Referenzverfahrens verwendet werden. ISO 16140-4 (für qualitative und quantitative Verfahren) und ISO 16140-5 (nur für quantitative Verfahren) können auch für die Validierung ohne Referenzverfahren verwendet werden.

Das Flussdiagramm in Bild 1 gibt einen Überblick über die Verbindungen zwischen den verschiedenen oben genannten Teilen. Ferner leitet es den Nutzer auch bei der Auswahl des richtigen Teils der Normenreihe ISO 16140 unter Berücksichtigung des Zwecks der Untersuchung und der vorstehenden Ausführungen an.

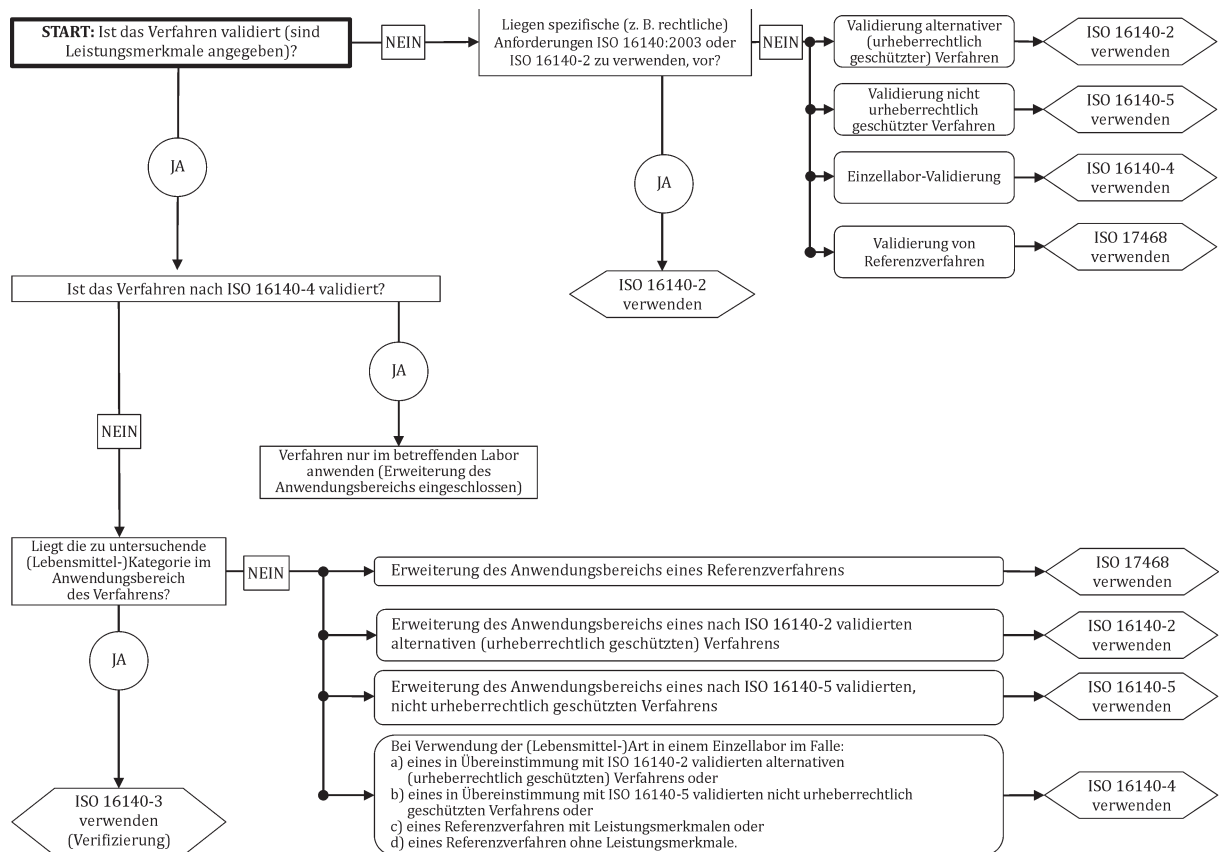


Bild 1 — Flussdiagramm für die Anwendung der Normenreihe ISO 16140 (Teil 2 bis Teil 5)

ANMERKUNG In diesem Dokument sind die Wörter „Kategorie“, „Typ“ und/oder „Einheit“ manchmal mit „(Lebensmittel)“ kombiniert, um die Lesbarkeit zu verbessern. Das Wort „Lebensmittel“ ist jedoch mit „Futtermittel“ und anderen Bereichen der Lebensmittelkette austauschbar, wie in Abschnitt 1 erwähnt.

ISO 16140-6 und ISO 16140-7 unterscheiden sich insofern von den anderen Teilen der Normenreihe ISO 16140, als sie sich auf sehr spezifische Situationen beziehen.

ISO 16140-6 ist auf die Bestätigungsprüfung für ein zu validierendes Verfahren beschränkt [z. B. die biochemische Bestätigung von *Enterobacteriaceae* (siehe ISO 21528-2)]. Die Bestätigungsprüfung wertet ein vermutetes (mutmaßliches) Ergebnis zu einem bestätigten positiven Ergebnis auf. Die Validierung alternativer Typisierungstechniken (z. B. Serotypisierung von *Salmonella*) wird ebenfalls in ISO 16140-6 behandelt. Die Validierungsuntersuchung in ISO 16140-6 legt die selektiven Agarmedien klar fest, unter deren Verwendung Stämme mithilfe des alternativen Bestätigungsverfahrens bestätigt werden können. Das alternative Bestätigungsverfahren kann, wenn es erfolgreich validiert wurde, nur angewendet werden, wenn Stämme auf einem Agar wiedergefunden werden, der bei der Validierungsuntersuchung verwendet wurde und dessen Annehmbarkeit im Rahmen der Validierungsuntersuchung nachgewiesen wurde. Bild 2 zeigt die Möglichkeiten, unter denen ein in Übereinstimmung mit ISO 16140-6 validiertes alternatives Bestätigungsverfahren angewendet werden kann (siehe Text in den Kästchen).

Referenzverfahren



Nach ISO 16140-2 validiertes alternatives Verfahren



Bild 2 — Anwendung validierter alternativer Bestätigungsverfahren (siehe ISO 16140-6)

Dieses Dokument, ISO 16140-7, behandelt die Validierung von Identifizierungsverfahren (z. B. die molekulare Identifizierung mithilfe von Multiplex-PCR oder DNA-Sequenzierung oder Massenspektrometrie). Dieses Dokument weicht von den anderen Teilen der Normenreihe ISO 16140 ab, da es kein Referenzverfahren für die mikrobielle Identifizierung gibt und es deshalb nicht möglich ist, eine Vergleichsuntersuchung vorzunehmen. Die Validierungsuntersuchung in diesem Dokument legt eine Identifizierungsdatenbank und ein oder mehrere Agarmedien fest, unter deren Verwendung Stämme identifiziert werden können. Das Identifizierungsverfahren kann, wenn es ordnungsgemäß charakterisiert und erfolgreich validiert wurde, nur für Stämme verwendet werden, die auf Agarmedien wiedergefunden werden, deren Annehmbarkeit im Rahmen der Validierungsuntersuchung nachgewiesen wurde.

Bild 3 zeigt die Möglichkeiten, unter denen ein in Übereinstimmung mit ISO 16140-6 validiertes alternatives Bestätigungsverfahren und ein in Übereinstimmung mit ISO 16140-7 validiertes alternatives Bestätigungsverfahren innerhalb eines Referenzverfahrens oder eines nach ISO 16140-2 validierten Nachweis- oder Zählverfahrens angewendet werden können. Die Ergebnisse des nach ISO 16140-7 validierten Verfahrens können als ergänzende Hinweise auf die Identität der untersuchten Kolonie(n) angesehen werden, nicht jedoch als Bestätigung. Bei einer Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des nach ISO 16140-6 validierten Verfahrens und des nach ISO 16140-7 validierten Verfahrens wird eine Ursachenanalyse vorgenommen. Ein nach ISO 16140-7 validiertes Verfahren kann auch zur Identifizierung von Kolonien im Rahmen von Verfahren verwendet werden, die keinen Bestätigungsschritt erfordern.

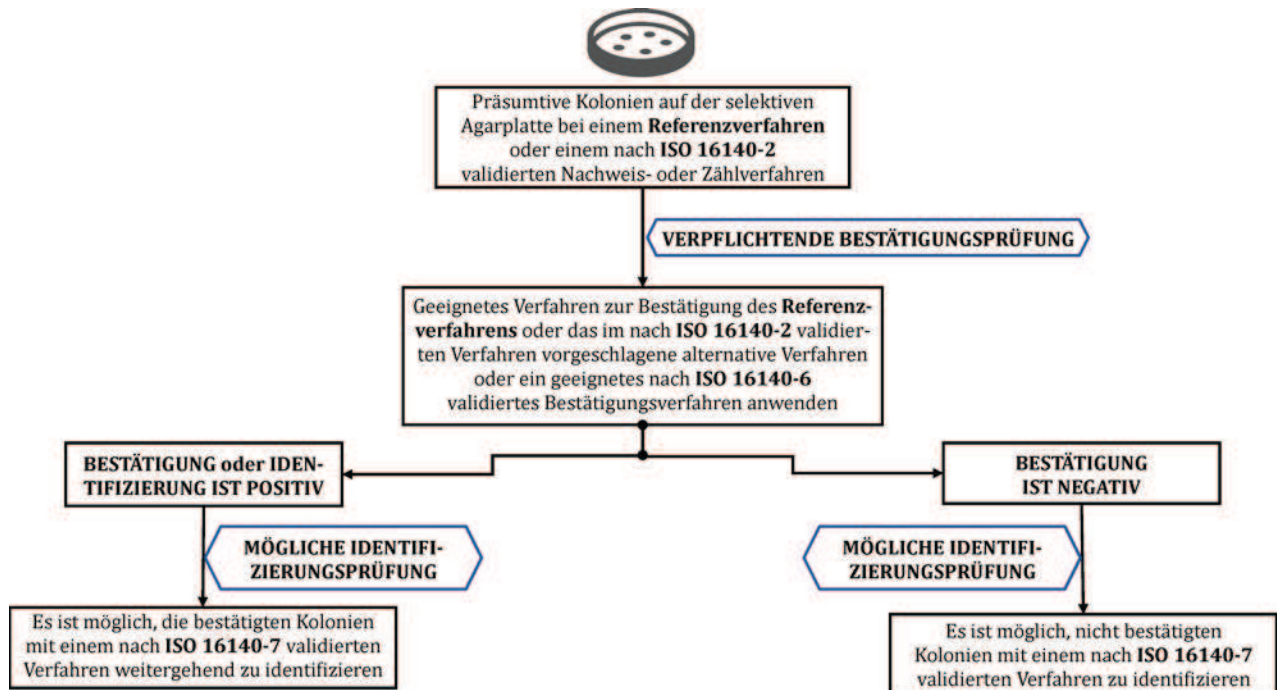


Bild 3 — Flussdiagramm für die Anwendung von ISO 16140-6 und ISO 16140-7 zur Bestätigung und Identifizierung von Kolonien innerhalb eines Referenzverfahrens oder eines nach ISO 16140-2 validierten Nachweis- oder Zählverfahrens

Wenn das Identifizierungsverfahren auch in Übereinstimmung mit ISO 16140-6 validiert ist, kann dasselbe Verfahren sowohl für die Bestätigung als auch für die Identifizierung verwendet werden.

Wenn ein Bestätigungsverfahren angewendet wird, ist es möglich, zur weiteren Identifizierung ein in Übereinstimmung mit ISO 16140-7 validiertes Identifizierungsverfahren anzuwenden.

0.2 Validierung und Verifizierung von Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen

Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren ist für die Validierung von Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen bestimmt. Das Verfahren umfasst zwei Teile, nämlich die Untersuchung der Leistungsmerkmale und einen Ringversuch.

Das Verfahren für die Validierung von Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen in einem Einzel-Labor wird in ISO 16140-4 beschrieben. Das Verfahren für die Verifizierung von Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen in einem Einzel-Labor wird in ISO 16140-3 beschrieben.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt die allgemeinen Grundsätze und die technische Arbeitsvorschrift für die Validierung von Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen in der mikrobiologischen Lebensmitteluntersuchung fest. Da es kein Referenzverfahren gibt, gibt dieses Dokument eine Arbeitsvorschrift für die Bewertung der Leistungsmerkmale und die Validierung des Verfahrensablaufs unter Verwendung wohldefinierter Stämme vor. Falls nötig kann ein ergänzendes Identifizierungsverfahren angewendet werden.

Dieses Dokument ist anwendbar auf die Validierung von Verfahren zur Identifizierung von Mikroorganismen, wobei es sich um Verfahren handelt, die angewendet werden bei der Analyse von Mikroorganismen in:

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

Validierte Identifizierungsverfahren können nicht anstelle einer Bestätigung verwendet werden, die beschrieben ist in:

- dem Referenzverfahren;
- einem in Übereinstimmung mit ISO 16140-2 validierten alternativen Verfahren;
- einem in Übereinstimmung mit ISO 16140-6 validierten alternativen Verfahren.

In diesen Fällen muss das Identifizierungsverfahren in Übereinstimmung mit ISO 16140-6 validiert werden, um als Bestätigungsverfahren verwendet werden zu können.

Dieses Dokument gilt insbesondere für Bakterien und Pilze. Einige Abschnitte sind im Einzelfall auf andere (Mikro-)Organismen anwendbar.

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 16140-1 und die folgenden Begriffe.

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

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

3.1

Zulässigkeitsgrenze

AL, en: acceptability limit

zulässige höchste positive oder negative Differenz zwischen dem Bezugswert (oder, falls nicht bekannt, dem anerkannten Bezugswert) eines Stammes oder einer Probe und einem einzelnen Ergebnis, das bei der Ausführung der Arbeitsanweisung eines Untersuchungsverfahrens erhalten wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: Im Kontext dieses Dokuments könnte der Bezugswert die zugewiesene Identität des Stammes sein.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.1, modifiziert – „einer Probe“ wurde ersetzt durch „eines Stammes oder einer Probe“; Anmerkung 1 zum Begriff wurde ersetzt.]

3.2

Genauigkeit

Identifizierungsgenauigkeit

Grad der Übereinstimmung zwischen einem Identifizierungsergebnis und der zugewiesenen Identität des untersuchten Stammes

Anmerkung 1 zum Begriff: Der Begriff „Identifizierungsgenauigkeit“ bezieht sich auf die Identität des Analyten, d. h. den oder die Gattungs- und/oder Artenbezeichnung(en).

Anmerkung 2 zum Begriff: „Identifizierungsgenauigkeit“ wird manchmal als Grad der Übereinstimmung mit dem Identifizierungsergebnis verstanden, das der durch ein anderes Identifizierungsverfahren ermittelten Identität des Stammes zugewiesen wird.

Anmerkung 3 zum Begriff: „Genauigkeit“ ist der in der klinischen Mikrobiologie üblicherweise verwendete Begriff für den Grad der Übereinstimmung zwischen einem Identifizierungsergebnis und der zugewiesenen Identität des untersuchten Stammes; der Begriff wurde aus Gründen der Einheitlichkeit gewählt.

Anmerkung 4 zum Begriff: Im Rahmen des Ringversuchs werden als Aspekte der Genauigkeit die Präzision und die systematische Abweichung ermittelt.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.2, modifiziert – In der Definition wurde „gemessenen Größenwert und einem zugewiesenen Größenwert einer Messgröße“ ersetzt durch „Identifizierungsergebnis und der zugewiesenen Identität des untersuchten Stammes“, Anmerkung 1 zum Begriff und Anmerkung 3 zum Begriff wurden modifiziert, Anmerkung 2 wurde gestrichen.]

[QUELLE: Title 21 – Food and drugs – Code of Federal Regulations (21 CFR), Parts 1-58, 800-1299]

[QUELLE: Richtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 27. Oktober 1998 über In-vitro-Diagnostika]

3.3

Übereinstimmung

Übereinstimmung der Identifizierung

die Untersuchung des zu validierenden Verfahrens ergibt das gleiche Identifizierungsergebnis wie die zugewiesene, d. h. ursprüngliche Identifizierung des untersuchten Stammes

3.4

zugewiesene Identität

die zugewiesene Identität ergibt sich daraus, dass der Mikroorganismus allgemein anerkannte molekulare und/oder biochemische Merkmale aufweist (z. B. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria)

3.5

Vergleichsalgorithmus

definierte Berechnungsregeln für den Vergleich des Profils des analysierten Stammes mit der Datenbank

3.6

Bestätigungsverfahren oder -prüfung

Verfahren oder Prüfung, das/die zur Verifizierung eines mutmaßlichen Ergebnisses durchgeführt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Nicht alle Verfahren verfügen über ein Bestätigungsverfahren.

Anmerkung 2 zum Begriff: Eine Bestätigungsprüfung kann ein positives oder negatives Ergebnis liefern, ohne die Identität des Analyten aufzudecken.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.17, modifiziert – Anmerkung 2 zum Begriff ergänzt.]

3.7

Datenbank

Bibliothek

Sammlung von Datenkategorien und Begriffseintragsstrukturen einer Identifizierungsdatenbank

Anmerkung 1 zum Begriff: In einer Identifizierungsdatenbank sind üblicherweise Informationen über den Phänotyp oder molekulare Daten mehrerer Stämme derselben Art oder Gattung zusammengetragen.

3.8

Diskrepanz

Identifizierungsdiskrepanz

die Untersuchung des zu validierenden Verfahrens liefert nicht das gleiche Identifizierungsergebnis wie die zugewiesene, d. h. ursprüngliche Identifizierung des untersuchten Stammes

3.9

Gruppe

Gruppe mikrobieller Ökosysteme

auf ähnliche Weise verarbeitete Proben mit ähnlichen intrinsischen Eigenschaften und einer ähnlichen mikrobiellen Ökologie (z. B. Kulturlösungen)

BEISPIEL Anreicherungsbouillons.

3.10

Homologie

Punktwert

Identität zwischen dem Profil des analysierten Stammes und dem Eintrag bzw. den Einträgen in der Datenbank

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Bestimmung erfolgt üblicherweise in Prozent oder mithilfe von Punktwerten.

Anmerkung 2 zum Begriff: Für bestimmte Identifizierungsverfahren (z. B. Mikroarray-Verfahren) ist unter Umständen kein Homologie-Punktwert ermittelbar.

3.11

Identifizierungsverfahren

zur Validierung vorgelegtes Verfahren

Analyseverfahren, mit dem sich der Name (die Identität) des Mikroorganismus (z. B. auf der taxonomischen Rangstufe der Art oder auf einer höheren taxonomischen Rangstufe) ermitteln lässt

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Verfahren kann urheberrechtlich geschützt sein.

Anmerkung 2 zum Begriff: Die Verfahren können auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen (z. B. auf einem phänotypischen bzw. molekularen Prinzip).

Anmerkung 3 zum Begriff: Die Identifizierung von Mikroorganismen kann helfen zu bestimmen, ob sie z. B. Anlass zu Sicherheitsbedenken geben, ob Verderb droht, ob sie einem spezifischen technologischen oder probiotischen Stamm angehören oder ob sie wahrscheinlich resistent gegenüber einer Inaktivierungsbehandlung sind.

3.12

Identifizierungsverfahren oder -prüfung

Verfahren oder Prüfung, mit dem/der sich die Identität des Analyten (z. B. auf der Rangstufe der Art oder auf einer höheren taxonomischen Rangstufe) ermitteln lässt

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Ergebnis der Identifizierungsprüfung kann nicht als Bestätigung betrachtet werden, wenn sie Teil eines Referenzverfahrens ist oder in Übereinstimmung mit ISO 16140-6:2019 validiert wurde.

3.13

Nachweisgrenze

LOD_x, en: level of detection

gemessene relative Analytkonzentration (im Verhältnis zur Gesamtlebendkeimzahl der Probe), die mit Hilfe 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.

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.35, modifiziert – In der Definition wurden „relative“ und „(im Verhältnis zur Gesamtlebendkeimzahl der Probe)“ hinzugefügt und Anmerkung 1 zum Begriff wurde gestrichen.]

3.14

(gezielte) Metagenomik

gleichzeitige parallele DNA-Sequenzierung mehrerer Mikroorganismen

3.15

Profil

Satz von Merkmalen, die einen Stamm identifizieren oder die zur Identifizierung eines Stammes verwendet werden

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Profil könnte phänotypisch (z. B. biochemisch oder serologisch) oder molekular (z. B. DNA-Fingerprint, DNA-Sequenz oder Massenspektrum) sein.

3.16

Risiko der Nichtidentifizierung

Wahrscheinlichkeit, dass innerhalb eines definierten Satzes Stämme im Anwendungsbereich der Validierung kein Identifizierungsergebnis erhalten wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Dies bezieht sich nicht auf eine falsche Identifizierung.

3.17

Anwendungsbereich der Validierung

Datenbankumfang und -version, Nährmedien oder Gruppe mikrobieller Ökosysteme und Vergleichsalgorithmus, auf die ein validiertes Verfahren für die Identifizierung von Mikroorganismen zufriedenstellend angewendet werden kann

[QUELLE: ISO 16140-1:2016, 2.70, modifiziert – In der Definition wurde „Analyten, Matrices und Konzentrationen“ ersetzt durch „Datenbankumfang und -version, Nährmedien oder Gruppe mikrobieller Ökosysteme und Vergleichsalgorithmus“.]

4 Allgemeine Grundsätze für die Validierung von Identifizierungsverfahren für Mikroorganismen

Die Arbeitsvorschrift für die Validierung umfasst zwei Phasen:

- eine Untersuchung der Leistungsmerkmale;
- einen Ringversuch.

ANMERKUNG 1 Für urheberrechtlich geschützte Verfahren wird die Validierungsuntersuchung von einem organisierenden Laboratorium (siehe ISO 16140-1:2016, 2.45) durchgeführt.

ANMERKUNG 2 Es ist möglich, bei einer Untersuchung nach diesem Dokument ggf. die in einer Validierungsuntersuchung nach ISO 16140-2 oder ISO 16140-6 gewonnenen Inklusivitäts- oder Exklusivitätsdaten zu berücksichtigen.

ANMERKUNG 3 Da es kein Referenz-Identifizierungsverfahren gibt, entfällt die Verfahrensvergleichsuntersuchung.

Die technischen Regeln für die Durchführung der Untersuchung der Leistungsmerkmale des Verfahrens und des Ringversuchs sind in Abschnitt 6 und Abschnitt 7 angegeben. Für beide Teile wird ein erweiterter Satz Stämme unter Verwendung eines nicht-selektiven Agars untersucht.

Gegebenenfalls, muss die Arbeitsvorschrift für die Validierung auch die selektiven Medien definieren, unter deren Verwendung Stämme mithilfe des Identifizierungsverfahrens identifiziert werden können. Es muss eine festgelegte Anzahl von Stämmen untersucht werden.

ANMERKUNG 4 Für den Begriff „Agar“ wird häufig auch „festes Nährmedium“ verwendet.

ANMERKUNG 5 Es sind andere Anwendungen von Identifizierungsverfahren möglich (z. B. die Identifizierung von Mikroorganismen in einem Ökosystem); für weitere Informationen siehe Anhang A.

5 Stämme

Die zur Bestimmung der Identifizierungsgenauigkeit des Verfahrens verwendeten reinen Stämme müssen im Hinblick auf den Zweck der Validierungsuntersuchung gut charakterisiert sein. Wenn nötig werden die durch eine zweite Identifizierung ermittelten Identifizierungsinformationen verwendet, um die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen des untersuchten Identifizierungsverfahrens und der zugewiesenen Identität des Stammes zu beurteilen.

ANMERKUNG 1 Im Rahmen solcher Untersuchungen könnten nationale, regionale oder internationale Referenzlabore kontaktiert werden.

ANMERKUNG 2 Gut charakterisierte Stämme sind Stämme, die nationalen/internationalen Kultursammlungen entnommen werden können oder lokal gewonnen sowie zuvor nach üblicherweise zwei oder mehr auf anderen Grundsätzen beruhenden Identifizierungsverfahren identifiziert und mit derselben Identität belegt wurden.

ANMERKUNG 3 Ggf. werden, soweit möglich, Stämme mit vorliegender vollständiger Genomsequenzierung (WGS, en: whole genome sequencing) in Übereinstimmung mit ISO 23418 ausgewählt.

6 Leistungsmerkmale eines Identifizierungsverfahrens

6.1 Allgemeines

Die Untersuchung der Leistungsmerkmale ist der Teil der Validierung, der in einem Einzel-Labor durchgeführt wird. Sie besteht aus einer Beschreibung des Konzepts und der Beschränkungen des Identifizierungsverfahrens sowie einer Untersuchung der Identifizierungsgenauigkeit des Verfahrens. Die Ergebnisse werden dann mit den zugewiesenen Identitäten des untersuchten Satzes Stämme verglichen.

6.2 Beschreibung des Konzepts und der Beschränkungen des Identifizierungsverfahrens

Die in Tabelle 1 beschriebenen Merkmale des Verfahrens müssen in der Arbeitsvorschrift des Verfahrens (z. B. Standardverfahrensanweisung oder Gebrauchsanweisung) sorgfältig beschrieben werden, um eine ordnungsgemäße Anwendung des Identifizierungsverfahrens durch den Endnutzer zu ermöglichen.

Tabelle 1 — Wesentliche Bestandteile der Untersuchung der Leistungsmerkmale

Merkmal	Detaillierte Informationen
Anwendungsbereich der Validierung	Beschreibung der Datenbank einschließlich Name, Version und Umfang Nährmedien Name oder Typ des Mikroorganismus (z. B. Bakterien, Hefepilze, Schimmelpilze, Milchsäurebakterien, <i>Listeriaceae</i>) Version des Vergleichsalgorithmus
Kurzbeschreibung des Identifizierungsverfahrens	Beschreibung des Profils/der Sequenz des Stammes und der für die Identifizierung von Mikroorganismen verwendeten Instrumentensignalerfassung
Datenbankumfang	Liste der Gattungen und Arten, die in der bei der Validierungsstudie verwendeten Datenbankversion enthalten sind
Datenbankkonzept	Beschreibung der Signalprofiltypen in der Datenbank, z. B. Auswahl eines einzelnen Profils als repräsentativ für verschiedene Stämme derselben Art oder mehrerer Signalprofile verschiedener Stämme derselben Art
Stämme je Art und Gattung in der Datenbank	Anzahl der Stämme je Art und Gattung Es sind mindestens 5 Stämme nötig, um in der Datenbank eine Art zu repräsentieren
Beschränkungen	Liste der eng miteinander verwandten Arten, die mit dem Identifizierungsverfahren nicht voneinander unterschieden werden können, Größe der Datenbank
Vergleichsalgorithmus	Berechnung der Ergebnisdarstellung, z. B. Vergleich des Instrumentensignalprofils für den analysierten Stamm mit allen einzelnen Profilen in der Datenbank oder Vergleich des Profils des analysierten Stammes mit unverwechselbaren Durchschnittsprofilen für jede Art in der Datenbank.
Ergebnisdarstellung	Beschreibung des für die Beurteilung der Identifizierungsergebnisse mit hohem oder niedrigerem Vertrauensniveau verwendeten Homologiekonzepts
Vorbereitung der Stämme und Fehlerbehebung	Beschreibung der Vorbereitung der Stämme und des Verfahrensablaufs, insbesondere wenn Homologieergebnisse mit niedrigem Vertrauensniveau oder überhaupt kein Identifizierungsergebnis gewonnen wurde

In einigen sehr speziellen Fällen darf die Mindestzahl der Stämme je Art in der Datenbank aufgrund des Mangels an verfügbaren Stämmen geringer als die geforderte Anzahl von 5 Stämmen sein. Die Datenbank sollte für Stämme, die die Mindestanforderung nicht erfüllen, einen Ausschlusshinweis enthalten.

6.3 Identifizierungsgenauigkeit des Identifizierungsverfahrens

6.3.1 Anzahl der Stämme, auf die zu prüfen ist

Der Satz der Stämme, auf die zu prüfen ist, hängt vom Datenbankumfang und vom Anwendungsbereich der Validierung ab. Soweit möglich wird ein Stamm je Art ausgewählt, um sicherzustellen, dass mindestens 25 % der Gattungen und 10 % der Arten in der Datenbank geprüft werden. Für die Stämme, auf die zu prüfen ist,

wurden jedoch eine Mindest- und eine Höchstzahl festgelegt, nämlich 250 bzw. 1 000. Bei Datenbanken mit begrenztem Umfang (z. B. 25 Gattungen und 200 Arten) werden alle Gattungen und Arten untersucht.

Bild 4 enthält Beispiele für die Vorgehensweise bei der Bestimmung der angemessenen Anzahl der zu prüfenden Stämme.

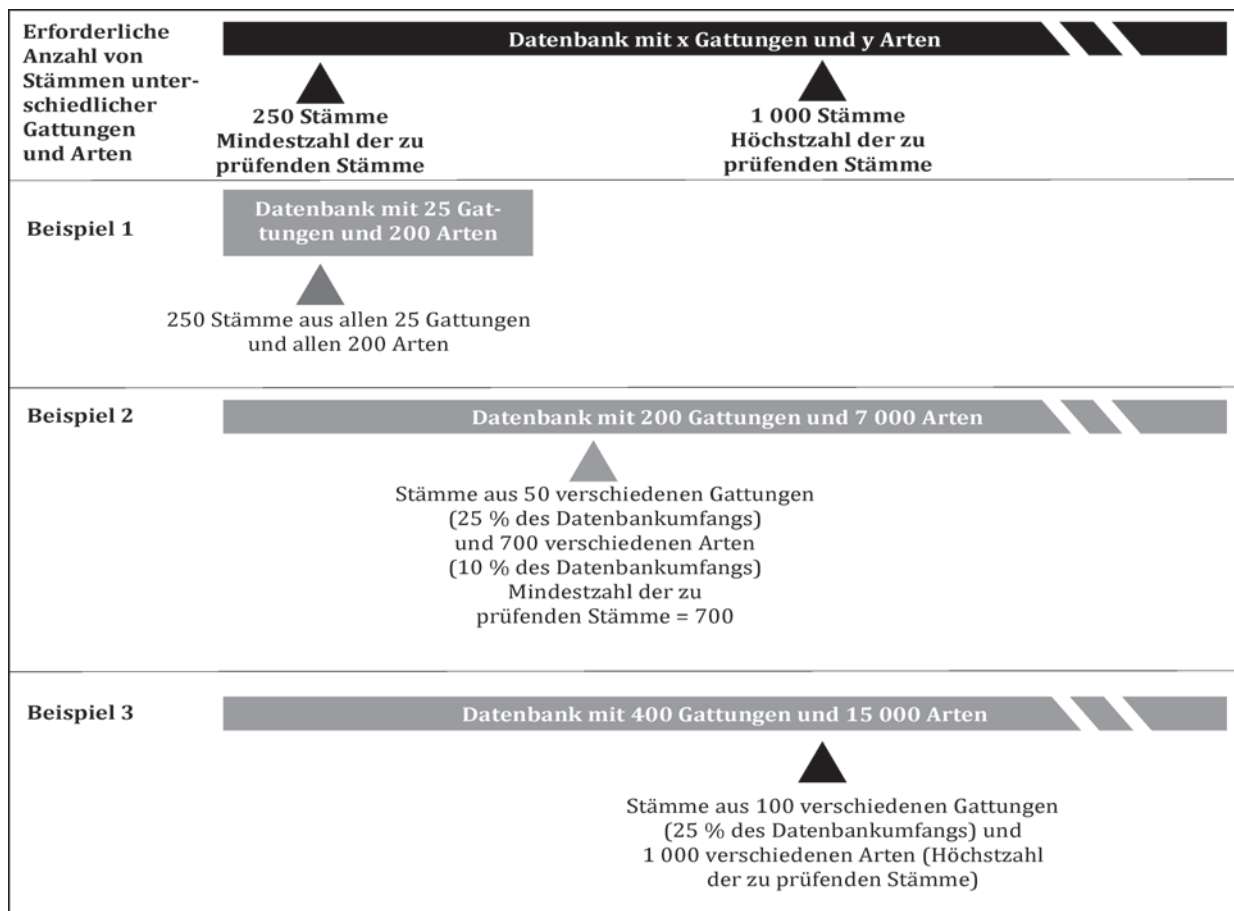


Bild 4 — Beispiele für die Vorgehensweise bei der Bestimmung der angemessenen Anzahl der Stämme, auf die zu prüfen ist

Für alle ausgewählten Stämme müssen Reinkulturen aus einem nicht-selektiven Agarmedium mit dem Identifizierungsverfahren geprüft werden.

ANMERKUNG 1 Nicht-selektive Agarmedien (z. B. TSA) ermöglichen die Wiederfindung eines breiten Spektrums an Mikroorganismen, wobei sie die Wiederfindung einiger definierter Gruppen von Mikroorganismen begünstigen können.

Wenn der Anwendungsbereich der Validierungsuntersuchung auch selektive Agarmedien umfasst, ist die Anzahl der relevanten Gattungen und Arten für jedes selektive Agarmedium, das in den Anwendungsbereich fällt, Tabelle 2 zu entnehmen.

ANMERKUNG 2 Selektive Agarmedien können die Wiederfindung von Mikroorganismen aus spezifischen Kladen, nämlich (i) einer Familie oder (ii) einer Gattung oder einer Gruppe von Arten (z. B. der Gruppe *Bacillus cereus*) ermöglichen. In diesem Dokument wird „Gruppe von Arten“ durch „Gattung“ ersetzt, um die Lesbarkeit zu verbessern. Das Wort „Gattung“ ist jedoch austauschbar mit „Gruppe von Arten“.

Tabelle 2 — Anzahl der Stämme, auf die für jedes der vom Anwendungsbereich umfassten selektiven Agarmedien zu prüfen ist

Taxonomischer Rang der auf den geprüften selektiven Agarmedien wiedergefundenen Stämme	Anzahl der Stämme, auf die für jedes der vom Anwendungsbereich umfassten selektiven Agarmedien zu prüfen ist
Familie	100 Stämme möglichst vieler unterschiedlicher Gattungen und Arten, einschließlich Stämmen unterschiedlicher Familien, die auf dem selektiven Agar gedeihen könnten
Gattung	50 Stämme möglichst vieler unterschiedlicher Arten, einschließlich Stämmen unterschiedlicher Gattungen, die auf dem selektiven Agar gedeihen könnten
Art	25 Stämme, die auf dem selektiven Agar gedeihen könnten

6.3.2 Auswahl der Stämme

Es muss ein breites Spektrum an Stämmen verwendet werden. Die Kriterien für die Auswahl von Prüfstämmen sind in Anhang B angegeben. Bei der Auswahl der Stämme sollten das Messprinzip (z. B. phänotypisch oder molekular basiert) und der Datenbankumfang des Identifizierungsverfahrens berücksichtigt werden. Verschiedene Messprinzipien können die Verwendung von Panels unterschiedlicher Prüfstämme erfordern, die die Diversität der untersuchten Mikroorganismen repräsentieren. Soweit möglich sollten die bei der Entwicklung der Datenbank verwendeten Stämme nicht zur Validierung des Identifizierungsverfahrens verwendet werden, es sei denn, die Verfügbarkeit von Stämmen ist begrenzt. In diesem Fall muss ein entsprechender Hinweis in den Bericht zur Validierungsuntersuchung aufgenommen werden. Die Begründung für die Auswahl der Stämme und ihrer Merkmale muss in den Bericht zur Validierungsuntersuchung aufgenommen werden (z. B. Abdeckung der Datenbank, eng verwandte Arten, kürzlich vorgenommene Änderungen in der Taxonomie).

Es werden Stämme von Arten ausgewählt, die sich auf dem Prüffagar wiederfinden lassen. Für selektive Agarmedien werden Prüfstämme aus mehreren Familien oder Gattungen ausgewählt.

Jeder Stamm muss so detailliert charakterisiert werden, dass sich seine zugewiesene Identität durch relevante phänotypische oder molekulare Prüfungen ermitteln lässt. Das für die Identifizierung angewendete Verfahren oder Verfahrensprinzip muss bekannt sein.

Die Stämme sollten abhängig vom Anwendungsbereich 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 verwendet werden. Die ursprüngliche Quelle aller Stämme 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. ISO 11133 enthält Leitlinien für die lokale Erhaltung von Stammkulturen.

Von einem spezialisierten Referenzlabor unter Anwendung eines geeigneten Identifizierungsverfahrens ermittelte Ergebnisse können verwendet werden, wenn das die Validierungsuntersuchung durchführende Labor nicht in der Lage ist, seltene Stämme zu identifizieren.

6.3.3 Untersuchung der Stämme

Reinkulturen aller ausgewählten Stämme auf einem nicht-selektiven Agar und den ausgewählten selektiven Agarmedien, die vom Anwendungsbereich der Validierung umfasst werden, müssen mit dem Identifizierungsverfahren untersucht werden.

Bei Diskrepanzen zwischen der zugewiesenen Identität eines untersuchten Stammes und dem mit dem Identifizierungsverfahren ermittelten Ergebnis wird eine Ursachenanalyse vorgenommen:

- Die Identifizierung des untersuchten Stammes wird sowohl mit dem für die Zuweisung der Identifizierung des Stammes verwendeten Verfahren bzw. Verfahrensprinzip als auch mit dem während der Validierungsuntersuchung bewerteten Identifizierungsverfahren wiederholt. Wenn die Diskrepanz sich bestätigt, wird der Stamm nach einem dritten Verfahren identifiziert.
- Das dritte Verfahren muss vorzugsweise andere Merkmale verwenden als das zunächst für die Zuweisung der Identität des Stammes verwendete und das zu validierende Identifizierungsverfahren.

6.3.4 Angabe und Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der auf (nicht-selektiven und selektiven) Agarmedien kultivierten Stämme werden wie in Tabelle 3 dargestellt angegeben, ergänzt um die abschließende Auswertung der Identifizierungsdiskrepanzen nach Tabelle 4. Das Ergebnis muss, vorzugsweise in Tabellenform, einschließlich einer Erläuterung in den Bericht zur Validierungsuntersuchung aufgenommen werden.

Da die Gattung ein höherer taxonomischer Rang ist als die Art, wird eine Diskrepanz auf Gattungsrang auch als Diskrepanz auf Artenrang betrachtet.

Falls das für die Ursachenanalyse verwendete dritte Verfahren die Identifizierungsdiskrepanz bestätigt, wird die abschließende Auswertung in Tabelle 4 als Diskrepanz der Identifizierungsgenauigkeit (**IAD**, en: identification accuracy deviation) angegeben; dabei wird spezifiziert, ob es sich um eine **IAD** auf Gattung- oder Artenrang handelt, d. h. **IAD_{Gattung}** oder **IAD_{Art}**.

Falls das für die Ursachenanalyse verwendete dritte Verfahren die Identifizierungsdiskrepanz nicht bestätigt, wird die abschließende Auswertung in Tabelle 4 als Übereinstimmung der Identifizierung (**IA**, en: identification agreement) angegeben.

ANMERKUNG 1 Anhang C enthält detaillierte Beispiele (Angabe, Auswertung und Bewertung der Ergebnisse).

Tabelle 3 — Ergebnisse der Identifizierungsgenauigkeitsuntersuchung

Unter- suchter Stamm	Für die Wieder- findung verwendete Agarmedien	Identität des Stammes		Identität des Stammes anhand des zu validierenden Verfahrens ^a	Auswertung der Ergebnisse (IA/ID/N0)
		Zuge- wiesene Identität	Identifizierungsverfahren oder Identifizierungs- verfahrensprinzip		
1					
2					
3					
usw.					
Legende IA: Übereinstimmung der Identifizierung (en: identification agreement), ID: Identifizierungsdiskrepanz (en: identification deviation), N0: keine Identifizierung ^a Ergebnisse ohne Identifizierung werden berücksichtigt. ANMERKUNG Die zugewiesene Identität der einzelnen Stämme umfasst mindestens: den Namen des Stammes, die Stammmummer in der (Kultur-)Sammlung und den Ursprung des Stammes. Es können weitere Merkmale hinzugefügt werden.					

Tabelle 4 — Auswertung der Identifizierungsdiskrepanzen bei der Identifizierungsgenauigkeitsuntersuchung

Unter- suchter Stamm	Zuge- wiesene Identität	Identität des Stammes anhand des zu validierenden Verfahrens ^a	Identität des Stammes anhand eines dritten Verfahrens, das auf einem anderen Prinzip beruht		Auswertung der Ergebnisse (IA/IAD _{Gattung} oder IAD _{Art})
			Verfahrens- prinzip	Identität des Stammes	
1					
2					
3					
usw.					
Legende IA: Übereinstimmung der Identifizierung (en: identification agreement), IAD _{Gattung} : Diskrepanz der Identifizierungsgenauigkeit (en: identification accuracy deviation) auf Gattungsrang, IAD _{Art} : Diskrepanz der Identifizierungsgenauigkeit auf Artenrang ANMERKUNG Die zugewiesene Identität der einzelnen Stämme umfasst mindestens: den Namen des Stammes, die Stammmummer in der (Kultur-)Sammlung und den Ursprung des Stammes. Es können weitere Merkmale hinzugefügt werden.					

ANMERKUNG 2 In einigen speziellen Fällen ist das zu validierende Verfahren in der Lage, Stämme auf einem niedrigeren taxonomischen Rang zu identifizieren als das oder die zum Vergleich herangezogene(n) Verfahren. Die Genauigkeit wird zunächst im Hinblick auf den taxonomischen Rang beurteilt, der den in der Validierungsstudie angewendeten Verfahren gemein ist. Bei der Bewertung des zu validierenden Verfahrens hinsichtlich der Genauigkeit der Identifizierung auf einem niedrigeren taxonomischen Rang werden weitere Informationen berücksichtigt, z. B. die vollständige Genomsequenzierung nach ISO 23418 oder andere relevante Fingerprints oder Sequenzen. Diese zusätzlichen Daten werden wie in Tabelle 4 angegeben ausgewertet.

6.4 Bewertung

Die Ergebnisse der Identifizierungsgenauigkeitsuntersuchung werden auf Basis der Auswertungen nach Tabelle 3 (Ergebnisse der Identifizierungsgenauigkeitsuntersuchung) und Tabelle 4 (Auswertung der Identifizierungsdiskrepanzen der Identifizierungsgenauigkeitsuntersuchung) für jedes der untersuchten Agarmedien wie in Tabelle 5 dargestellt zusammengefasst (als Gesamtzahlen für N0, IA und IAD).

Tabelle 5 — Zusammenfassung der Ergebnisse der Identifizierungsgenauigkeitsuntersuchung

Untersucher Agar	Anzahl der Stämme (N)				
		IA	N0	IAD _{Gattung}	IAD _{Art}
x					
usw.					
Legende N: Anzahl der Stämme, IA: Übereinstimmung der Identifizierung (en: identification agreement), N0: Anzahl der nicht identifizierten Stämme, IAD _{Gattung} : Diskrepanz der Identifizierungsgenauigkeit (en: identification accuracy deviation) auf Gattungsrang, IAD _{Art} : Diskrepanz der Identifizierungsgenauigkeit auf Artenrang					

Das Risiko der Nichtidentifizierung (R_{ni}) wird für jedes der untersuchten Agarmedien im definierten Anwendungsbereich der Validierung nach Gleichung (1) berechnet und auf eine Dezimalstelle gerundet:

$$R_{ni} (\%) = \frac{N0}{N} * 100 \quad (1)$$

Die Identifizierungsgenauigkeit (IAC, en: identification accuracy) auf Gattungs- und Artenrang wird für jedes der untersuchten Agarmedien nach Gleichung (2) und Gleichung (3) berechnet und auf eine Dezimalstelle gerundet.

$$IAC_{Gattung} (\%) = \frac{N - N0 - IAD_{Gattung}}{N - N0} * 100 \quad (2)$$

$$IAC_{Art} (\%) = \frac{N - N0 - IAD_{Art}}{N - N0} * 100 \quad (3)$$

Die Ergebnisse werden aufgezeichnet.

Für jedes der untersuchten Agarmedien wird Tabelle 6 verwendet, um die Ergebnisse der Identifizierungsgenauigkeit (IAC) auf Gattungs- und Artenrang entsprechend den angegebenen Zulässigkeitsgrenzen (AL, en: acceptability limit) zu bewerten. Die AL ist eingehalten, wenn $100 - IAC_{Gattung}$, $100 - IAC_{Art}$ kleiner oder gleich den in Tabelle 6 aufgeführten Werten für die Zulässigkeitsgrenze sind.

Die definierten Zulässigkeitsgrenzen beziehen sich auf die einzelnen in der Validierungsuntersuchung bewerteten nicht-selektiven oder selektiven Agarplatten.

Wird die AL nicht eingehalten, sollten weitere Untersuchungen (z. B. eine Ursachenanalyse) durchgeführt werden, um eine Erklärung für die beobachteten Ergebnisse zu erhalten. Die Gebrauchstauglichkeit des Identifizierungsverfahrens wird dann auf Grundlage der AL und der zusätzlichen Informationen aus den weiteren Untersuchungen bestimmt. Die Gründe für die Annahme des Identifizierungsverfahrens bei Nichteinhaltung der AL müssen im Bericht zur Validierungsuntersuchung angegeben werden.

ANMERKUNG Anhang C enthält detaillierte Beispiele (Angabe, Auswertung und Bewertung der Ergebnisse).

Tabelle 6 — Bewertung der Ergebnisse der Identifizierungsgenauigkeitsuntersuchung

Untersuchte Agarmedien	Identifizierungsgenauigkeit auf Gattungsrang (in %)			Identifizierungsgenauigkeit auf Artenrang (in %)		
	$100 - IAC_{Gattung}$	AL	Bewertung ^a	$100 - IAC_{Art}$	AL	Bewertung ^a
Nicht-selektiver Agar für die Validierung eines breiten Spektrums an Mikroorganismen (z. B. Bakterien, Hefepilze, Schimmelpilze)		3			6	
Für die Validierung eines begrenzten Spektrums an Mikroorganismen (z. B. Milchsäurebakterien) geeigneter Agar		3			6	

Untersuchte Agarmedien	Identifizierungsgenauigkeit auf Gattungsrang (in %)			Identifizierungsgenauigkeit auf Artenrang (in %)		
	100 – IAC _{Gattung}	AL	Bewertung ^a	100 – IAC _{Art}	AL	Bewertung ^a
Auf Familienrang selektiver Agar		3			4	
Auf Gattungsrang selektiver Agar		3			4	
Auf Artenrang selektiver Agar		0			4	
Legende IAC _{Gattung} : Identifizierungsgenauigkeit (en: identification accuracy) auf Gattungsrang, IAC _{Art} : Identifizierungsgenauigkeit auf Artenrang, AL: Zulässigkeitsgrenze (en: acceptability limit). ^a Bewertung: Die Ergebnisse werden als „akzeptiert“ oder „nicht akzeptiert“ angegeben.						

7 Ringversuch

7.1 Allgemeines

Das Ziel des Ringversuches ist die Bestimmung der Variabilität der von verschiedenen Teilnehmern unter Verwendung derselben Stämme (unter Vergleichbedingungen) erhaltenen Ergebnisse. Nach Möglichkeit sollten die Versuchsbedingungen die normale Streuung zwischen Laboratorien widerspiegeln.

7.2 Zu erfassende Datensätze

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

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

- Von jedem Teilnehmer müssen insgesamt 24 Stämme untersucht werden, wobei alle Stämme nach dem Identifizierungsverfahren unter Verwendung einer nicht-selektiven Agarplatte zu untersuchen sind. Die 24 ausgewählten Stämme müssen die Bandbreite der Gattungen/Arten im Anwendungsbereich des Identifizierungsverfahrens abbilden und so vielfältig wie möglich sein.
- Wenn der Anwendungsbereich der Validierung selektive Agarmedien umfasst, müssen insgesamt 8 zusätzliche Stämme untersucht werden. Die Auswahl der untersuchten selektiven Agarmedien sollte auf der Grundlage ihres jeweiligen Wirkprinzips erfolgen. Diese 8 Stämme dürfen ggf. aus den insgesamt 24 untersuchten Stämmen ausgewählt werden.
- Beim Ringversuch müssen Stämme verwendet werden, die mit allen im Rahmen der Identifizierungsgenauigkeitsuntersuchung untersuchten Identifizierungsverfahren richtig identifiziert wurden.

7.3 Arbeitsvorschrift

Die Stämme müssen vom organisierenden Laboratorium vorbereitet werden, um die Homogenität der (aus der jeweiligen Reinkultur des Prüfstammes hervorgegangen) Versandchargen sicherzustellen.

Das organisierende Laboratorium muss die Stämme vor dem Versand blind kodieren.

Je nach den Merkmalen der zu versendenden Stämme kann der Versand der Stämme zum Beispiel auf Agartransporttupfern, in Agarröhrchen oder auf nicht-selektiven Agarplatten erfolgen.

Beim Versand von Stämmen müssen die geltenden sicherheitstechnischen Anforderungen an den Transport berücksichtigt werden.

Das organisierende Laboratorium muss den Teilnehmern ausreichende Informationen für die sichere Handhabung der Stämme nach deren Eingang und für deren Aufbewahrung sowie Arbeitsvorschrift(en) für die Untersuchung und die Angabe der Ergebnisse zur Verfügung stellen.

Die Analyse der Stämme beginnt mit dem Isolieren der Stämme auf den zu untersuchenden Agarmedien, bevor das Identifizierungsverfahren durchgeführt wird.

Platten und/oder Stämme müssen für einen bestimmten Zeitraum aufbewahrt werden, damit bei Bedarf von einem Teilnehmer erhaltene Ergebnisse bestätigt werden können.

Die Untersuchung der Stämme muss von jedem Teilnehmer innerhalb einer festgelegten Frist durchgeführt werden.

Für die Auswertung werden mindestens 240 Ergebnisse für einen nicht-selektiven Agar und 80 für jeden verwendeten selektiven Agar (10 vollständige Datensätze) benötigt.

Nach Abschluss des Ringversuchs müssen alle Angaben auf den Erfassungsbögen und die Ergebnisse dem organisierenden Laboratorium vorgelegt und geprüft werden. Daten eines Teilnehmers müssen verworfen werden, wenn

- er Stämme/Testkits usw. erhalten hat, die während des Transports beschädigt wurden;
- er Medienzusammensetzungen verwendet hat, die nicht dem Verfahren entsprechen;
- die gemeldeten technischen Ergebnisse nahelegen, dass das Laboratorium entweder von der Arbeitsvorschrift bzw. den Arbeitsvorschriften für die Untersuchung oder von entscheidenden Betriebsbedingungen abgewichen ist.

7.4 Angabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden für jeden der im Ringversuch untersuchten Stämme in Tabellenform dargestellt, wie in Tabelle 7 angegeben.

Alle Ergebnisdiskrepanzen müssen zusammen mit einer Erläuterung in den Bericht zur Validierungsuntersuchung aufgenommen werden.

Tabelle 7 — Ergebnisse des Ringversuchs

Teilnehmer	Identifizierung bei Verwendung eines nicht-selektiven Agars		Identifizierung bei Verwendung eines selektiven Agars ^a	
	Anzahl der falsch identifizierten Stämme (Nic)	Anzahl der richtig identifizierten Stämme (IA)	Anzahl der falsch identifizierten Stämme (Nic)	Anzahl der richtig identifizierten Stämme (IA)
Teilnehmer 1	/24	/24	/8	/8
Teilnehmer 2	/24	/24	/8	/8

Teilnehmer	Identifizierung bei Verwendung eines nicht-selektiven Agars		Identifizierung bei Verwendung eines selektiven Agars ^a	
	Anzahl der falsch identifizierten Stämme (Nic)	Anzahl der richtig identifizierten Stämme (IA)	Anzahl der falsch identifizierten Stämme (Nic)	Anzahl der richtig identifizierten Stämme (IA)
usw.	/24	/24	/8	/8
Teilnehmer 10 ^b	/24	/24	/8	/8
Summe	/240	/240	/80	/80
Legende (Nic): umfasst die Anzahl der nicht identifizierten Stämme (N0) und die Diskrepanz der Identifizierungsgenauigkeit (IAD, en: identification accuracy deviation), IA: Übereinstimmung der Identifizierung (en: identification agreement). ^a Im Ringversuch wird ein Vertreter jedes Typs der auf ihre Leistungsmerkmale untersuchten Agarmedien bewertet. ^b Es sind mindestens 10 Teilnehmer erforderlich, falls verfügbar dürfen jedoch weitere hinzugenommen werden.				

7.5 Auswertung und Bewertung

Die Ergebnisse des Ringversuchs werden für jedes der untersuchten Agarmedien wie in Tabelle 8 (als Gesamtzahlen für N0, IA und IAD) auf Basis der Auswertungen nach Tabelle 7 (Ergebnisse des Ringversuchs) zusammengefasst.

Tabelle 8 — Zusammenfassung der Ergebnisse des Ringversuchs

Untersuchter Agar	Anzahl der Stämme (N)				
		IA	N0	IAD _{Gattung}	IAD _{Art}
x					
usw.					
Legende N: Anzahl der Stämme, IA: Übereinstimmung der Identifizierung (en: identification agreement), N0: Anzahl der nicht identifizierten Stämme, IAD _{Gattung} : Diskrepanz der Identifizierungsgenauigkeit (en: identification accuracy deviation) auf Gattungsrang, IAD _{Art} : Diskrepanz der Identifizierungsgenauigkeit auf Artenrang					

Das Risiko der Nichtidentifizierung (R_{ni}) im definierten Anwendungsbereich der Validierung wird anhand der Daten aller Teilnehmer nach Gleichung (1) berechnet und auf eine Dezimalstelle gerundet.

Die Identifizierungsgenauigkeit (IAC) auf Gattungs- und Artenrang wird für jedes der untersuchten Agarmedien nach Gleichung (2) und Gleichung (3) berechnet und auf eine Dezimalstelle gerundet.

Die Ergebnisse werden aufgezeichnet.

Für jedes der untersuchten Agarmedien wird Tabelle 9 verwendet, um die Ergebnisse der Identifizierungsgenauigkeit (IAC) auf Gattungs- und Artenrang entsprechend den angegebenen Zulässigkeitsgrenzen (AL) zu bewerten.

Die AL ist eingehalten, wenn **100 – IAC_{Gattung}** und **100 – IAC_{Art}** jeweils kleiner oder gleich den in Tabelle 9 aufgeführten Werte für die Zulässigkeitsgrenze sind.

Wird die AL nicht eingehalten, sollten weitere Untersuchungen (z. B. eine Ursachenanalyse) durchgeführt werden, um eine Erklärung für die beobachteten Ergebnisse zu erhalten. Die Gebrauchstauglichkeit des Identifizierungsverfahrens wird dann auf Grundlage der AL und der zusätzlichen Informationen aus den weiteren Untersuchungen bestimmt. Die Gründe für die Annahme des Identifizierungsverfahrens bei Nichteinhaltung der AL müssen im Bericht zur Validierungsuntersuchung angegeben werden.

ANMERKUNG Anhang C enthält detaillierte Beispiele (Angabe, Auswertung und Bewertung der Ergebnisse).

Tabelle 9 — Bewertung der Ergebnisse des Ringversuchs

Untersuchte Agarmedien	Identifizierungsgenauigkeit auf Gattungsrang (in %)			Identifizierungsgenauigkeit auf Artenrang (in %)		
	100 – IAC _{Gattung}	AL	Bewertung ^a	100 – IAC _{Art}	AL	Bewertung ^a
Nicht-selektiver Agar für die Validierung eines breiten Spektrums an Mikroorganismen (z. B. Bakterien, Hefepilze, Schimmelpilze)		4			6	
Für die Validierung eines begrenzten Spektrums an Mikroorganismen (z. B. Milchsäurebakterien) geeigneter Agar		3			5	
Auf Familienrang selektiver Agar		3			3	
Auf Gattungsrang selektiver Agar		2			3	
Auf Artenrang selektiver Agar		0			0	
Legende IAC _{Gattung} : Identifizierungsgenauigkeit (en: identification accuracy) auf Gattungsrang, IAC _{Art} : Identifizierungsgenauigkeit auf Artenrang, AL: Zulässigkeitsgrenze (en: acceptability limit). ^a Bewertung: Die Ergebnisse werden als „akzeptiert“ oder „nicht akzeptiert“ angegeben.						