



Ohne Klassifizierung

Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie

Dokument Nr. 328.dw

Vorwort

Der Text dieser Richtlinie wurde von Mitgliedern einer Expertengruppe des Bundes, des Kantonalen Vollzugs und der Privatwirtschaft erarbeitet, welche unter der Leitung der Schweizerischen Akkreditierungsstelle (SAS) arbeitete. Er basiert auf der ISO/IEC 17025 (1), der Richtlinie EURACHEM (2), ISO 16140 (3), ISO 7218 (4), AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines (5, 6) und weiterer Literatur (7- 31).

Zusammensetzung der Expertengruppe:

A. BAUMGARTNER, Bundesamt für Gesundheit, 3003 Bern
T. BISCHOFBERGER, UFAG Laboratorien AG, 6310 Sursee
B. BISSIG-CHOISAT, Bundesamt für Veterinärwesen, 3003 Bern
M. DALLA TORRE, Agroscope Liebefeld-Posieux, 3003 Bern
H. EMCH, SAS, 3003 Bern
J.-L. GAFNER, Agroscope Liebefeld-Posieux, 1725 Posieux
Ph. HÜBNER, Kantonales Laboratorium Basel Stadt, 4012 Basel
R. MEYER, NESTEC SA., 1350 Orbe
Ch. MÜLLER, Kantonales Laboratorium, 5000 Aarau
P. SCHEFFELDT, SAS, 3003 Bern
U. SPAHR, Bundesamt für Gesundheit, 3003 Bern
R. STEPHAN, Institut für Lebensmittelsicherheit und -hygiene, 8057 Zürich
U. WÄSPI, COOP Zentrallabor, 4133 Pratteln

Revision 03 durch:

A. BAUMGARTNER, Bundesamt für Gesundheit, 3003 Bern
J.-L. GAFNER, Agroscope Liebefeld-Posieux, 1725 Posieux
J. HUMMERJOHANN, Agroscope Liebefeld-Posieux, 3003 BERN
Ch. MÜLLER, Amt für Verbraucherschutz, 5000 Aarau
B. PLASCHY, Schweizerische Akkreditierungsstelle, 3003 Bern
U. WÄSPI, Süsselab AG, 3052 Zollikofen

Revision 04 durch:

C. Fricker-Feer, HOCHDORF Swiss Nutrition Ltd., 6281 Hochdorf
G. Gremaud, Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, 3003 Bern
Ph. Hübner, Kantonales Labor Basel-Stadt, 4012 Basel
J. Hummerjohann, Agroscope Liebefeld, 3003 Bern
R. Meyer, Nestlé PTC Konolfingen, 3510 Konolfingen
Ch. Müller, Amt für Verbraucherschutz, 5000 Aarau
B. Plaschy, Schweizerische Akkreditierungsstelle, 3003 Bern
J. Schmid, Amt für Verbraucherschutz und Veterinärwesen, Kantonales Labor, 9001 St. Gallen

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	4
2.	Auswahl, Verifizierung und Validierung von Methoden	4
2.1	Allgemeines.....	4
2.2	Auswahl der Methode	5
2.3	Validierung	6
2.4	Anwendungsbereich	7
2.5	Spezifität / Relative Spezifität	8
2.6	Sensitivität / Relative Sensitivität	8
2.7	Richtigkeit / Relative Richtigkeit.....	8
2.7.1	Bestimmung mit einer Zweitmethode	8
2.7.2	Bestimmung über künstliche Kontamination (Spiken)	9
2.7.3	Bestimmung mit einem Referenzmaterial.....	9
2.8	Präzision	9
2.9	Nachweisgrenze	10
2.10	Bestimmungsgrenze	10
2.11	Statistische Übereinstimmung	11
2.11.1	Qualitative Methoden	11
2.11.2	Quantitative Methoden.....	11
3.	Messunsicherheit	12
3.1	Abschätzung der Messunsicherheit von qualitativen mikrobiologischen Prüfverfahren	13
3.1.1	Falsch-Positiv-Rate	13
3.1.2	Falsch-Negativ-Rate	13
3.2	Abschätzung der Messunsicherheit von quantitativen mikrobiologischen Prüfverfahren	13
3.3	Angabe der Messunsicherheit	14
4.	Literatur	15
5.	Key words	17
Anhang - Übergangsregelung (gültig bis 30.04.2022) für die Methoden des Schweizerischen Lebensmittelbuchs (SLMB)		18

1. Einleitung

Jeder experimentell erzeugte Messwert ist mit Unsicherheiten behaftet, welche der Aussagekraft der eingesetzten Methode Grenzen setzt. Die Validierung untersucht und charakterisiert Prüfverfahren auf diese Leistungsgrenzen. Sie belegt, dass ein Prüfverfahren sich unter Berücksichtigung der Unsicherheiten für die Erfüllung einer bestimmten Aufgabe eignet.

Dieser Leitfaden beschreibt die Vorgehensweise zur Validierung und Abschätzung der Messunsicherheit von mikrobiologischen Prüfverfahren.

Mikrobiologische Analysen bestehen in der Regel aus folgenden 7 Schritten:

- | | |
|--|----------------------|
| 1. Probenahme | |
| 2. Transport / Lagerung | |
| 3. Probenvorbereitung (z. B. Auswahl des Untersuchungsgutes, homogenisieren, verdünnen) | Präanalytischer Teil |
| <hr/> | |
| 4. Voranreicherung und Anreicherung (qualitative Analyse) oder dezimale Verdünnungsreihen (quantitative Analyse) | Analytischer Teil |
| 5. Isolation, Auszählung | |
| 6. Bestätigung (Confirmation) | |
| 7. Auswertung | |

Ziel des präanalytischen Teils ist es, Proben derart zu erheben und gegebenenfalls aufzubewahren, dass der mikrobiologische Status nicht verfälscht werden kann und das zu entnehmende Aliquot repräsentativ für die Gesamtheit des Untersuchungsgutes ist. Dieser präanalytische Teil ist schwierig quantitativ zu erfassen. Die Unsicherheit bei der Probenahme ist in den meisten Fällen beträchtlich.

Der vorliegende Leitfaden behandelt nur den analytischen Teil; für die Aspekte des präanalytischen Teils wird auf die Literatur verwiesen [z. B. spezifische Probenahme und Menge des Untersuchungsgutes: Codex Alimentarius (17), ICMSF (18), SAS (19) und Badewasser (20, 21)]. Er beschreibt ein Vorgehen zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit durch ein Einzellabor (7).

2. Auswahl, Verifizierung und Validierung von Methoden

2.1 Allgemeines

Validierung gemäss SN EN ISO 9000:2015 (16): „Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises [...], dass die Anforderungen [...] für einen spezifischen beabsichtigten Gebrauch oder eine spezifische beabsichtigte Anwendung erfüllt worden sind.“

Das Ziel der Validierung von Prüfverfahren ist nachvollziehbar den Nachweis zu erbringen, dass die vorgegebene, spezifische Prüfaufgabe erfüllt ist.

Verifizierung gemäss SN EN ISO 9000:2015 (16): „Bestätigung durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises [...], dass festgelegte Anforderungen [...] erfüllt worden sind.“

2.2 Auswahl der Methode

Der Umfang der Validierung (Auswahl der Matrices, Anzahl Proben, Aufwand für die einzelnen Leistungskriterien) richtet sich nach der beabsichtigten Anwendung und den bereits anderweitig durchgeführten Validierungen.

Mögliche Quellen für anderweitig validierte Methoden sind:

- a) Methode als internationale, regionale oder nationale Norm veröffentlicht (z. B. ISO, EN, SN)
- b) Methode von zuständiger nationaler oder internationaler Behörde (z. B. §64 LFGB, BAFU, EU)
- c) Methode von technischer nationaler oder internationaler Organisation (z. B. AOAC, OIV, IFU)
- d) Methode aus einschlägigem wissenschaftlichen Text (z. B. Zeitschrift)
- e) Methode durch den Hersteller der Prüfeinrichtung oder anderem Lieferanten (z. B. Kithersteller) bereitgestellt
- f) Methode von Kunden

Idealerweise soll die Methode in einer gemeinsamen Studie nach einem international anerkannten Protokoll (z. B. ISO 16140) validiert sein.

Sind die Ergebnisse der Validierung, d.h. die relevanten Leistungskriterien verfügbar und belegen diese, dass die Methode für den beabsichtigten Gebrauch geeignet ist, dann muss das Labor verifizieren, dass es die für den beabsichtigten Gebrauch relevanten Leistungskriterien reproduzieren kann.

Der Anwendungsbereich (Produkte, Matrix, Messbereich usw.) ist in der Methodenbeschreibung definiert. Er kann vom Labor eingeschränkt werden.

Das heisst, bei der Einführung von validierten Methoden muss eine Verifizierung stattfinden. Im Minimum muss folgendermassen gezeigt werden, dass die Methode adäquat ist und intern beherrscht wird:

- Der Anwendungsbereich (z. B. Matrix) der Methode ist definiert und dem Labor bekannt.
- Die Leistungsfähigkeit (z. B. gemäss ISO-Norm, Literatur) der Methode ist dem Labor – soweit vorhanden - bekannt. Siehe Tabelle 1.
- Das Labor muss an einem Proficiency Test oder - falls nicht verfügbar - einem Laborvergleich erfolgreich teilgenommen haben.
- Wenn externe Vergleiche nicht möglich sind, muss eine laborinterne Präzision (Wiederhol- und allenfalls eine Laborpräzision) bestimmt werden.
- Abschätzung der Messunsicherheit: Grundsätzlich ist bei klassischen mikrobiologischen Methoden +/- 0.5 log anzunehmen (7).

Falls die relevanten Leistungskriterien nicht verfügbar sind, sind diese durch das Labor selbst im Rahmen einer Validierung gemäss Kapitel 2.3 zu bestimmen.

Wenn Änderungen an validierten Verfahren vorgenommen werden, muss der Einfluss der Änderung ermittelt werden. Dasselbe gilt, falls das Verfahren ausserhalb des Anwendungsbereichs, der in der Methodenbeschreibung definiert ist, angewendet werden soll. Entsprechend ist die Modifikation zu validieren.

2.3 Validierung

Der Umfang einer Validierung wird auch durch die der Methode zu Grunde liegenden Fragestellung bestimmt.

Bei der Validierung von Methoden muss prinzipiell zwischen qualitativen und quantitativen Prüfverfahren unterschieden werden.

A.) Qualitative Verfahren (Ja/Nein Entscheid)

Bei qualitativen Verfahren (z. B. Nachweis pathogener Mikroorganismen) geht es um die Frage, ob die Mikroorganismen in einer bestimmten Matrix vorhanden sind oder nicht.

B.) Quantitative Verfahren

Bei Methoden zur Überwachung von Limiten (Grenzwerte, Spezifikationen) konzentriert sich der Validierungsaufwand vor allem auf die Bereiche um die fraglichen Limiten. Den grössten Validierungsaufwand benötigen Methoden, mit denen Analyten über einen grossen Bereich bestimmt werden müssen (z. B. Monitoring im Umweltmikrobiologiebereich).

In der Regel hat die vollständige Validierung und die Abschätzung der Messunsicherheit einer Methode nachfolgende Kriterien zu umfassen (Tabelle 1).

Tabelle 1. Validierungskriterien und Messunsicherheit

<i>Kriterium</i>	<i>qualitative Methode</i>	<i>quantitative Methode</i>
Anwendungsbereich (Kap. 2.4)	X	X
Spezifität (Kap. 2.5)	X	X
Sensitivität (Kap. 2.6)	X	X
Richtigkeit/Relative Richtigkeit (Kap. 2.7)	X	X
Präzision (2.8)	X	X
Nachweisgrenze (Kap. 2.9)	X	
Bestimmungsgrenze (Kap. 2.10)		X
Statistische Übereinstimmung (Kap. 2.11)	X	X
Falsch-Positiv-Rate (Kap. 3.1.1)	X	
Falsch-Negativ-Rate (Kap. 3.1.2)	X	
Messunsicherheit (Kap. 3.2)		X

Falls auf die Bearbeitung einzelner Punkte verzichtet wird, ist dies schriftlich zu begründen (z. B. Anwendungsbereich ist weit von Nachweisgrenze entfernt, Hinweis auf Erfahrungswerte aus Laborvergleichsstudien etc.).

Bei der Validierung mikrobiologischer Nachweisverfahren ist zu unterscheiden zwischen neuen Verfahren, für die keine genormten Prüfanweisungen (Standard- bzw. Referenzmethoden) bestehen und Alternativverfahren (z. B. Schnellverfahren) zu bereits existierenden Referenzmethoden.

Alternativmethoden werden grundsätzlich mittels Methodenvergleich validiert. Nach Lebensmittelgesetzgebung, Art. 5 der Hygieneverordnung (11) sind andere Untersuchungsmethoden als die aufgeführten Referenzmethoden zulässig, wenn sie anhand der Referenzmethode

nach international anerkannten Protokollen (z. B. ISO 16140) validiert sind und zu gleichen Beurteilungen führen wie die Referenzmethoden.

Für den qualitativen Methodenvergleich eignet sich in vielen Fällen der Vierfeldertest (29) (Abb. 1).

Abb. 1. Auswerteschema für Vierfeldertest (29)

zu validierende Methode		+	-	Σ
Referenzmethode	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
	Σ	a+c	b+d	a+b+c+d = n

- +: positiver Nachweis resp. positive Beurteilung
- : negativer Nachweis resp. negative Beurteilung
- a: Anzahl der bei beiden Methoden positiven Analyseergebnisse
- b: Anzahl der falsch negativen Analyseergebnisse bezüglich Referenzmethode
- c: Anzahl der falsch positiven Analyseergebnisse bezüglich Referenzmethode
- d: Anzahl der bei beiden Methoden negativen Analyseergebnisse
- n: Gesamtanzahl Analyseergebnisse

2.4 Anwendungsbereich

In Abhängigkeit des vorgesehenen Anwendungsbereiches sind die Untersuchungen an einer bzw. mehreren Produkte- und Lebensmittelkategorien (Matrices) durchzuführen. Ist die Methode nur für den Nachweis von Mikroorganismen in einem Produkt (z. B. Trinkwasser) bestimmt, ist diese Matrix bei den Untersuchungen einzusetzen. Handelt es sich um eine horizontale Methode (z. B. Nachweis in allen Lebensmitteln) sind die Untersuchungen jeweils an mindestens 4 verschiedenen Produkte- (z. B. Gebrauchsgegenstände) und Lebensmittelkategorien durchzuführen.

Für einen Methodenvergleich sind pro jeweilige Produkte- und Lebensmittelkategorie mindestens 20 verschiedene natürlich kontaminierte und mindestens 20 verschiedene natürlich nicht kontaminierte Proben sowohl mit der zu validierenden Alternativ- als auch mit der Referenzmethode zu untersuchen. Ist es nicht möglich eine genügende Anzahl natürlich kontaminierter Proben aufzutreiben, ist eine künstliche Kontamination von Proben erlaubt. Das Vorgehen der künstlichen Kontamination ist genau zu beschreiben.

Bei neuen Methoden sind pro jeweilige Produkte- und Lebensmittelkategorie mindestens 20 mit verschiedenen Stämmen des Zielorganismus künstlich kontaminierte und mindestens 20 nicht mit dem Zielorganismus, jedoch mit anderen (sinnvoll gewählten) Keimarten kontaminierte Proben zu untersuchen. Dabei sollte die Keimzahl mindestens zehn Mal über der Nachweisgrenze (für qualitative Methoden) respektive der Bestimmungsgrenze (für quantitative Methoden) sein. Die künstlich kontaminierten Proben sollen das Spektrum der (natürlicherweise) vorkommenden Eigenflora abdecken.

Mögliche Lebensmittelkategorien sind in den Anhängen der AOAC Richtlinien (5, 6) und der ISO-Norm 16140 (3) aufgeführt. Bei ihrer Auswahl für die Validierung eines mikrobiologischen Prüfverfahrens sind die Kenntnisse über Prävalenz der nachzuweisenden Mikroorganismen in einzelnen Lebensmittelkategorien, resp. in Umweltproben (Bodenproben, Klärschlamm, Abwasser), sowie deren Relevanz für die menschliche Gesundheit zu berücksichtigen.

2.5 Spezifität / Relative Spezifität

Die Spezifität einer Methode bezeichnet das Mass der Beeinflussung der Methode durch weitere in der Probe vorhandene Keime (Nicht-Zielkeime).

Für qualitative Prüfverfahren berechnet sich die Spezifität als $[d/(c+d)]$ 100 % und gibt an, wie viel Prozent aller sicher negativen Proben als negativ erkannt werden (vgl. Abb. 1, Falsch-Positiv-Rate).

Für quantitative Prüfverfahren wird die Spezifität durch die Fähigkeit bestimmt, das Vorhandensein (Konzentration) des Zielorganismus in einer Probe ohne Interferenz mit Nicht-Zielorganismen oder mit der Probenmatrix genau zu messen.

Es wird von der gleichen Spezifität einer zu validierenden Methode im Vergleich zur Referenzmethode ausgegangen, wenn der Zielorganismus auch mit der Referenzmethode nicht nachgewiesen wird (relative Spezifität).

2.6 Sensitivität / Relative Sensitivität

Die Sensitivität bezeichnet die Fähigkeit eines Prüfverfahrens innerhalb einer gegebenen Matrix leichte Änderungen in der Anzahl Mikroorganismen nachzuweisen (Zielkeime).

Für qualitative Prüfverfahren berechnet sich die Sensitivität als $[a/(a+b)]$ 100 % und gibt an, wie viel Prozent aller sicher positiven Proben als positiv erkannt werden (vgl. Abb. 1, Falsch-Negativ-Rate).

Bei quantitativen Methoden wird die Sensitivität als die minimale Änderung in der Keimkonzentration in der Probe bestimmt, welche für eine signifikante Änderung der Keimzahl nötig ist.

Es wird von der gleichen Sensitivität einer zu validierenden Methode im Vergleich zur Referenzmethode ausgegangen, wenn der Zielorganismus auch mit der Referenzmethode nachgewiesen wird (relative Sensitivität).

2.7 Richtigkeit / Relative Richtigkeit

Die Richtigkeit ist das Ausmass der Abweichung des Messergebnisses vom "richtigen Wert", und berücksichtigt den systematischen Fehler (englisch: trueness, Messabweichung, bias = lack of trueness). Im Rahmen der Validierung ist die Richtigkeit die am schwierigsten zu bestimmende Unsicherheit einer Methode. Gründe dafür liegen beispielsweise in der mangelnden Kenntnis über Vermehrungsfähigkeit (viability) und Verteilung der Mikroorganismen in der Matrix. Die Richtigkeit ist experimentell bei mikrobiologischen Methoden in der Regel nicht erfassbar, daher wird in der Regel von relativer Richtigkeit gesprochen. Sehr oft wird die Abweichung vom robusten Mittelwert in Ringversuchen oder Proficiency Tests als Mass der relativen Richtigkeit herangezogen.

2.7.1 Bestimmung mit einer Zweitmethode

Die Bestimmung der relativen Richtigkeit kann mit einer validierten Zweitmethode, wenn möglich einer Referenzmethode, durchgeführt werden. Die relative Richtigkeit bezeichnet den Grad der Übereinstimmung der Resultate, welche mit der zu validierenden Methode und der Referenzmethode pro Matrix an mindestens 20 Proben erhalten werden.

Für qualitative Prüfverfahren berechnet sich die relative Richtigkeit als $[(a+d)/n] 100 \%$ und gibt die geschätzte Wahrscheinlichkeit in Prozenten an, dass die beiden Methoden des Methodenvergleichs die gleichen Resultate ergeben (vgl. Abb. 1).

Bei quantitativen alternativen Prüfverfahren wird der Mittelwert (\bar{d}) aller Differenzen zwischen den Resultaten mit der Referenzmethode (x_R) und mit der Alternativmethode (x_A) erhaltenen Resultate berechnet. Dieser Wert darf nicht signifikant von null verschieden sein.

2.7.2 Bestimmung über künstliche Kontamination (Spiken)

Wenn kein zertifiziertes Referenzmaterial und keine Zweitmethode zur Verfügung stehen, wird die relative Richtigkeit durch künstliche Kontaminationen („Spiken“) bestimmt. Die nachzuweisenden Mikroorganismen werden zu mindestens 10 Proben zugegeben. Dann werden die Konzentrationen der allenfalls kontaminierten sowie der künstlich kontaminierten Proben bestimmt.

Für qualitative neue Prüfverfahren berechnet sich die relative Richtigkeit als $[(a+d)/n] 100 \%$ und gibt die geschätzte Wahrscheinlichkeit (in Prozenten) an, mit welcher die neue, zu validierende Methode die realen Kontaminationen der Probe nachweist (vgl. Abb. 1).

Bei quantitativen alternativen Prüfverfahren wird der Mittelwert (\bar{d}) aller Differenzen zwischen den realen Kontaminationswerten und mit der neuen Methode erhaltenen Resultate berechnet (vgl. Tab. 3). Dieser Wert darf nicht signifikant von null verschieden sein (siehe 2.11.2).

2.7.3 Bestimmung mit einem Referenzmaterial

Die relative Richtigkeit kann auch mit zertifiziertem Referenzmaterial bestimmt werden. Im Allgemeinen genügen 6-10 Bestimmungen. Wenn kein zertifiziertes Referenzmaterial, aber ein gut beschriebenes Material (z. B. Proben aus Ringversuchen oder Proficiency Tests) vorhanden ist, sollte die Richtigkeit mit diesem überprüft werden.

2.8 Präzision

Die Präzision beschreibt die zufällige Abweichung von Werten um einen Mittelwert. Man unterteilt sie in Wiederhol-, Vergleichs- und Laborpräzision.

Wiederholpräzision (Wiederholbarkeit, repeatability): Unter Wiederholpräzision wird der Vergleich von Resultaten wiederholter Messungen derselben homogenisierten Probe (nach Stomacher) unter gleichen Bedingungen (gleiche Personen, Labors, Geräte, Reagenzien, Umgebungsbedingungen) verstanden. Die Wiederholgrenze (repeatability limit) wird mit r angegeben.

Zur Abschätzung der Wiederholpräzision ist pro jeweilige Matrix die gleiche Probe mit einem Gehalt des Zielkeimes im Anwendungsbereich mindestens 5 Mal unter gleichen Bedingungen zu untersuchen.

Bei qualitativen Prüfverfahren berechnet sich $r = \frac{x}{n}$

x = Anzahl übereinstimmende Resultate unter Wiederholbedingungen

n = Anzahl Messungen

Im Bereich der Nachweisgrenze ist $r = 0.5$ (siehe 2.9).

Für quantitative Prüfverfahren gilt $r = 2,8 s_r$; s_r = Standardabweichung der unter Wiederholbarkeitsbedingungen erzielten Messresultate. Der Faktor 2,8 setzt sich zusammen aus: $2 \cdot \sqrt{2}$; 2 kommt von der Normalverteilung (95 % Konfidenzintervall); Wurzel 2 beruht darauf, dass sich r auf die Differenz von 2 einzelnen Prüfreihen beziehen (12).

Vergleichspräzision (Reproduzierbarkeit, Vergleichbarkeit, reproducibility): Unter Vergleichspräzision wird der Vergleich von Resultaten mit demselben Verfahren, aber ausserhalb

des Labors verstanden (z. B. Proficiency Tests mit gleicher Probe, verschiedene Zeiten, anderes Labor, andere Person, andere Apparatur, andere Reagenzien etc.). Die Vergleichsgrenze (R, reproducibility limit) ergibt sich aus Methodenvergleichsstudien. Falls solche Daten aus Ringversuchen und/oder Proficiency Tests (31) vorhanden sind, sind diese in den Validierungsunterlagen aufzuführen. Die Vergleichspräzision ist jedoch nicht Gegenstand dieses Leitfadens, da sie die Mitwirkung mehrerer Laboratorien voraussetzt.

Laborpräzision (laborinterne Vergleichspräzision, intermediate precision): Unter Laborpräzision wird der Vergleich von Resultaten wiederholter Messungen derselben homogenisierten Probe unter verschiedenen Bedingungen (verschiedene Personen, verschiedene Messgeräte, verschiedene Tage, verschiedene Chargen der Reagenzien etc.) verstanden.

Anmerkung:

Idealerweise gilt für die Standardabweichung der Anzahl ausgezählter Kolonien auf einer Platte die Poisson-Verteilung $\sigma = \sqrt{n}$. In der Praxis sind doppelt so grosse Standardabweichungen jedoch durchaus akzeptabel (9). Laboruntersuchungen zeigten des Weiteren auf, dass mit 50 % bis 70 % der grösste Anteil an der Gesamtvarianz eines quantitativen mikrobiologischen Nachweisverfahrens auf die Komponente "Probe" fällt (Stichwort: Probeninhomogenität), während die methodenbedingte Varianz bei geübtem Laborpersonal nur 4 % bis 10 % und die aufgrund der Poissonverteilung unvermeidliche statistische Plattierungsvarianz ca. 25 % ausmacht (13). Die Wiederholgrenze ist in der Regel kleiner als die Vergleichsgrenze (R, reproducibility limit). Anstelle der experimentellen Bestimmung der Wiederholpräzision kann deshalb bei der Validierung von quantitativen mikrobiologischen Prüfverfahren die bei internationalen mikrobiologischen Proficiency Tests für die Berechnung des z-score üblicherweise verwendete Standardabweichung von 0,5 log₁₀ herangezogen werden.

2.9 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze von qualitativen Prüfverfahren beschreibt die kleinste Anzahl Zielkeime, welche mit einer vorgegebenen statistischen Sicherheit entdeckt werden kann.

Zur Abschätzung der Nachweisgrenze von qualitativen Prüfverfahren sind pro jeweilige Matrix Verdünnungsreihen von mindestens drei verschiedenen Konzentrationen (tief: 1 bis 10 KBE, mittel: 10 bis 100 KBE und hoch: grösser als 100 KBE) mit mindestens 4 verschiedenen Stämmen des Zielorganismus anzusetzen, die Matrices künstlich zu kontaminieren und mit der zu validierenden Methode zu untersuchen. Eine Negativkontrolle ist mitzuführen.

Die Resultate der Untersuchungen der künstlich kontaminierten Proben werden mit der realen Kontamination verglichen. Als Nachweisgrenze gilt der kleinste mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % (LOD₅₀) erkennbare Gehalt einer Probe, das heisst, die Konzentration bei der die Hälfte der Ergebnisse positiv ausfällt (8, 9, 10, 12).

2.10 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze ist die Anzahl der Keime, die mit einer vorgegebenen Richtigkeit und Präzision quantitativ erfasst werden kann.

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze sind pro jeweilige Matrix Verdünnungsreihen von mindestens drei verschiedenen Konzentrationen mit mindestens 4 verschiedenen Stämmen des Zielorganismus anzusetzen, die Matrices künstlich zu kontaminieren und mit der zu validierenden Methode zu untersuchen. Eine Negativkontrolle pro Matrix ist mitzuführen.

Die Resultate der Untersuchungen der künstlich kontaminierten Proben werden mit der realen Kontamination verglichen. Die Bestimmungsgrenze ist der tiefste Wert, bei dem die relative Richtigkeit und die Wiederholpräzision einen vorgegebenen Wert einhalten.

In ISO 7218 (4) werden für eine statistisch gesicherte numerische Auswertung von mikrobiologischen Nachweisverfahren grundsätzliche Angaben zur Gesamtbelegungsdichte und zur spezifischen Belegungsdichte gemacht. Eine numerische Resultatangabe erfolgt in der Regel nur bei Auszählung von mindestens 10 Kolonien (Ausnahme unverdünntes Untersuchungsgut wie Trinkwasser oder Milch).

2.11 Statistische Übereinstimmung

2.11.1 Qualitative Methoden

Für den Vergleich qualitativer Methoden bieten sich zur statistischen Auswertung so genannte „nicht-parametrische“ Testverfahren wie der Vierfeldertest (z. B.: χ^2 - Test nach McNemar) oder die Bestimmung des Konkordanzindex Kappa an. Da für die Anwendung des χ^2 - Test nach McNemar die Summe der abweichenden Resultate (b+c, vgl. Abb. 1) mindestens 8 sein muss, was insbesondere beim Nachweis pathogener Bakterien nur durch eine hohe Anzahl Untersuchungsproben und/oder durch klare Unterschiede in der Sensitivität der beiden Testverfahren erfüllt werden kann, wird die Berechnung des Konkordanzindex Kappa für die Validierung von mikrobiologischen Prüfverfahren als praktikable Alternative dem χ^2 - Test nach McNemar vorgezogen.

Der Konkordanzindex Kappa zeigt das Mass der Übereinstimmung zweier Prüfverfahren bezüglich eines Analysemerkmals an und wird wie folgt berechnet:

$$\text{Kappa} = 2 (ad-bc)/[(a+c)(c+d)+(a+b)(b+d)];$$
 Bedeutung von a, b, c, d, vgl. Abb. 1

Die Bewertung erfolgt als Übereinstimmung je nach Wert von Kappa.

Tabelle 2. Bewertung des Konkordanzindex Kappa (28)

Kappa	Übereinstimmung
<0,10	keine
0,10 - 0,40	schwache
0,41 - 0,60	deutliche
0,61 - 0,80	starke
0,81 - 1,00	fast vollständige

2.11.2 Quantitative Methoden

Vergleiche quantitativer Methoden werden mittels parametrischer, nichtparametrischer, beziehungsweise robuster Testverfahren statistisch ausgewertet. Dabei handelt es sich um Tests für den Vergleich zweier abhängiger Stichproben bzw. für den Vergleich gepaarter Beobachtungen (z. B. t-Test, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Akzeptanzkriterium ist Nicht-Signifikanz mit Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0.05$ (d.h. p-Wert > 0.05).

Keimzahlen grösser als 100 KBE/g sind vor der statistischen Auswertung die Keimzahlen zu logarithmieren.

Ergibt die zu validierende Methode die gleichen Resultate wie die Referenzmethode oder entspricht sie den reellen Kontaminationen, beträgt der Mittelwert der Differenzen der beiden Messresultate (\bar{d}) null.

Tabelle 3. Auswerteschema für quantitative Nachweisverfahren

Probe	Abhängige Wertepaare (Resultate)		Differenz (Methode A-R)
	Referenzmethode resp. reelle Kontamination (R)	zu validierende-Methode (A)	
1	X_{R1}	X_{A1}	d_1
..			
i	X_{Ri}	X_{Ai}	d_i
..			
n	X_{Rn}	X_{An}	d_n
Mittelwerte	\bar{x}_R	\bar{x}_A	$\bar{d} \pm s_d$

X_{Ri} : i -ter Messwert mit Referenzmethode

X_{Ai} : i -ter Messwert mit Alternativmethode

Gleichwertig zum t-Test kann mit dem Vertrauensintervall geprüft werden:

Der berechnete Mittelwert der Differenzen (\bar{d}) wird überprüft durch Berechnung des 95 % Vertrauensintervalls und dessen Vergleich mit dem theoretischen Wert Null:

Wenn $|\bar{d}| < \frac{t_{krit} \cdot s_d}{\sqrt{n}}$, dann besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mess-

reihen. Dabei bezeichnet t_{krit} den kritischen Wert aus Student's Test Tabelle für $n-1$ Freiheitsgrade (95 % Vertrauensintervall; $t_{dfn-1; 0.975}$), s_d die Standardabweichung der gemessenen Differenzen und n die Anzahl Wertepaare.

Zur Bestimmung der Korrelation zweier Methoden sind die durch beide Untersuchungsmethoden ermittelten Keimzahlen einer linearen Regressionsanalyse zu unterziehen. Die graphische Darstellung der durch die Referenz- und Alternativmethode gewonnenen Resultate von jeder Probe, wobei die x-Achse für die Referenz- und die y-Achse für die Alternativmethode zu verwenden ist, wird auf Ausreisser überprüft. Neben der graphischen Überprüfung bietet sich als Ausreissertest der Cochran-Test, der Dixon-Test oder der Grubbs-Test an (3, 10, 27, 29), anzuwenden auf die Residuen der Regressionsgleichung.

Beide Methoden sind äquivalent, wenn die berechnete Regressionsgleichung nicht signifikant von der theoretischen Gerade "y = x" abweicht. Das 95 % Vertrauensintervall für die berechnete Steigung m der Regressionsgeraden beinhaltet bei äquivalenten Methoden den Wert eins.

Wenn $|m - 1| < t_{krit} \cdot s_m$, dann ist die Steigung m der Regressionsgerade statistisch nicht von eins verschieden. Dabei bezeichnet t_{krit} den kritischen Wert aus Student's Test Tabelle für $n-2$ Freiheitsgrade (95 % Vertrauensintervall; $t_{n-2; 0.975}$) und s_m die Standardabweichung der Steigung der Regressionsgeraden.

3. Messunsicherheit

Die Messunsicherheit ist ein „dem Messergebnis zugeordneter Parameter, der die Streuung der Werte kennzeichnet, die vernünftigerweise der Messgrösse zugeordnet werden könnte“ (21). Die Messunsicherheit resultiert von experimentell bestimmten Unsicherheiten und/oder geschätzten Unsicherheiten. Sie muss das gesamte Prüfverfahren umfassen. Bezieht sich das Ergebnis auf eine homogenisierte Probe, umfasst die Messunsicherheit nur den analytischen Teil. Andernfalls muss auch der präanalytische Teil berücksichtigt werden. Es muss aus dem Prüfbericht hervorgehen, worauf sich die Messunsicherheit bezieht.

Der Aufwand für die Ermittlung der Messunsicherheit hängt von der analytischen Problemstellung ab (22-28).

3.1 Abschätzung der Messunsicherheit von qualitativen mikrobiologischen Prüfverfahren

Das obige Konzept der Unsicherheit kann nicht direkt auf qualitative Prüfergebnisse, wie man sie z. B. bei reinen Nachweistests oder der Bestimmung von Merkmalen/Kriterien zur Identifizierung erhält, angewandt werden. Dennoch sollten einzelne Variabilitätsquellen, wie Inoculum, Reagenzien, Matrixeffekte und Interpretation des die Analyse durchführenden Mitarbeiters, identifiziert werden und es sollte nachgewiesen werden, dass diese unter Kontrolle stehen. Wichtige Anhaltspunkte liefern die Falsch-Positiv- und die Falsch-Negativ-Rate.

3.1.1 Falsch-Positiv-Rate

Die Falsch-Positiv-Rate errechnet sich als Quotient aus der Anzahl falsch positiver Resultate und der Anzahl negativer Proben beim Referenzverfahren bzw. Anzahl nicht mit dem Zielorganismus künstlich kontaminierter Proben.

Die Falsch-Positiv-Rate berechnet sich für qualitative Prüfverfahren als $[c/c+d]$ 100 % und gibt an, wie viel Prozent der Proben mit dem alternativen Prüfverfahren als falsch positive Befunde gewertet wurden (vgl. Abb. 1). Falsch positive Befunde müssen unbedingt als solche durch weitere Charakterisierung der Keime bestätigt werden.

3.1.2 Falsch-Negativ-Rate

Die Falsch-Negativ-Rate errechnet sich als Quotient aus der Anzahl falsch negativer Resultate und der Anzahl positiver Proben beim Referenzverfahren bzw. Anzahl mit dem Zielorganismus künstlich kontaminierter Proben.

Die Falsch-Negativ-Rate berechnet sich für qualitative Prüfverfahren als $[b/a+b]$ 100 % und gibt an, wie viel Prozent der Proben mit dem alternativen Prüfverfahren als falsch negative Befunde gewertet wurden (vgl. Abb. 1).

3.2 Abschätzung der Messunsicherheit von quantitativen mikrobiologischen Prüfverfahren

Gemäss EURACHEM Guideline (2) fallen mikrobiologische Untersuchungen üblicherweise in die Kategorie, die eine strenge metrologisch und statistisch gesicherte Berechnung der Messunsicherheit ausschliesst. Im Allgemeinen kann die Schätzung der Unsicherheit allein auf die Daten aus der Wiederhol- und Vergleichspräzision gestützt werden, idealerweise allerdings sollte die Richtigkeit unter Einbeziehung von systematischen Abweichungen (*bias*) z. B. aus Ergebnissen von Eignungsprüfungen (Proficiency Tests) mitberücksichtigt werden (sofern Lebensmittelmatrixen!).

Die einzelnen Komponenten der Unsicherheit sollten identifiziert werden und es sollte nachgewiesen werden, dass sie unter Kontrolle stehen, und deren Beitrag zur Variabilität der Ergebnisse sollte bewertet werden. Einige Komponenten (z. B. Pipettierung, Wäge- und Verdünnungseffekte) können leicht gemessen und einfach bewertet werden, um nachzuweisen, dass sie einen vernachlässigbaren Beitrag zur Gesamtunsicherheit beisteuern. Andere Komponenten (z. B. Probenstabilität und Probenvorbereitung) sind nicht direkt messbar und ihr Beitrag kann statistisch nicht bewertet werden, aber ihre Wichtigkeit für die Variabilität der Ergebnisse sollte auch berücksichtigt werden.

Alle Analyseverfahren, so auch die mikrobiologischen, sind mit einer Messunsicherheit behaftet. Aufgrund der Erfahrungen aus Proficiency Tests lässt sich die Messunsicherheit von Plattenverfahren (Guss-, Spatel- und Tropftechnik) abschätzen. Diese beträgt erfahrungsgemäss \pm eine halbe 10er Potenz (7).

Die Stelle zeigt die Einhaltung z. B. anhand einer Regelkarte (z. B. Werte aus Proficiency Tests) bei quantitativen Prüfungen.

3.3 Angabe der Messunsicherheit

Die Messunsicherheit muss gemäss ISO 17025 (1) auf dem Prüfbericht angegeben werden, wenn sie:

- für die Gültigkeit oder Anwendung der Prüfergebnisse von Bedeutung ist,
- vom Kunden verlangt wurde oder
- die Einhaltung von vorgegebenen Grenzen in Frage stellt.

Wird die Messunsicherheit angegeben, so muss aus dem Prüfbericht hervorgehen worauf sie sich bezieht.

Beispiel für die Angabe eines Resultats mit der Messunsicherheit für ein Vertrauensintervall von 95 %:

Aerobe mesophile Gesamtkeimzahl in Rohmilch: $(3.4 \pm 0.5) \log \text{KBE/ml}^*$

* Die angegebene Messunsicherheit auf den untersuchten Teil der Probe deckt ein Vertrauensintervall von 95 % ab.

Berücksichtigung der Messunsicherheit von mikrobiologischen Prüfverfahren in der Lebensmittelgesetzgebung

Laut Auskunft des Bundesamtes für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen ist die Messunsicherheit in den gesetzlich vorgegebenen mikrobiologischen Kriterien inbegriffen.

4. Literatur

Validierung

1. ISO/IEC 17025:2005 Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien.
2. EURACHEM Second Edition 2013 Accreditation for Microbiological Laboratories. <http://www.european-accreditation.org/publications>
3. ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. ISO/CD 16140-3 Microbiology of the food chain – Method validation – Part3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory.
4. ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
5. AOAC INTERNATIONAL Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation, J. AOAC Int. 82: 402-415 (1999).
6. *Feldsine, P., Abeyta, C. and Andrews, W. H.*: AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. J. AOAC Int. 85: 1187-1200 (2002).
7. *Hübner, P., Gautsch, S. and Jemmi, Th.*: In House validation (Single Laboratory Validation) of Microbiological Methods. Mitt. Lebensm. Hyg. 93: 118-139 (2002).
8. MicroVal Rules and Certification Scheme Version 7 (October 2012). <http://www.microval.org/rules.html>
9. Protocole de Validation d'une méthode alternative commerciale par rapport à une méthode de référence Révision 2 – Adoptée par AFNOR Certification le 17 mai 2013. https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/04/NF148_Protocole-General-Validation_fr.pdf
10. NordVal Validation: Protocol for the validation of alternative microbiological methods (2009). <http://www.nmkl.org/dokumenter/nordval/NordValProtocol.pdf>
11. Verordnung des EDI über die Hygiene beim Umgang mit Lebensmitteln (Hygieneverordnung EDI, HyV) vom 16. Dezember 2016, SR 817.024.1
12. *Kromidas, Stavros*: Handbuch Validierung in der Analytik. WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 2. überarb. und erg. Auflage 2011.
13. *Berg, C., Dahms, S., Hildebrandt, G., Klatwchka, S. und Weiss, H.*: Microbiological collaborative studies for quality control in food laboratories: Reference material and evaluation of analyst's errors. Int. J. Food Microbiology 24, 41-52 (1994).
14. JCGM 200:2012, International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM). <http://www.bipm.org/en/publications/guides/>
15. ISO 13843:2000, Water quality – Guidance on validation of microbiological methods.

16. SN EN ISO 9000:2015, Qualitätsmanagementsystem – Grundlagen und Begriffe.

Probenahme

17. Codex Alimentarius CAC/GL 50-2004: General Guidelines on Sampling. <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/>
18. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF): Microorganisms in Foods 2 – Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. Second edition, 1986. University of Toronto Press, Toronto, Canada. <http://www.icmsf.org/pdf/icmsf2.pdf>
19. Leitfaden zum zweckmässigen Vorgehen beim präanalytischen Teil von mikrobiologischen Untersuchungen im Bereich der Lebensmittelproduktion. SAS Dokument 333.dw, Rev. 1, 2013.
20. Beurteilung der Badegewässer: Empfehlungen zur Untersuchung und Beurteilung der Badewasserqualität von See- und Flussbädern. Herausgegeben vom Bundesamt für Umwelt BAFU und vom Bundesamt für Gesundheit BAG, Bern 2013.
21. SIA-Norm 385/9, Wasser und Wasseraufbereitungsanlagen in Gemeinschaftsbädern, 2011.

Messunsicherheit

22. JCGM 100: 2008, Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), 2008. <http://www.bipm.org/en/publications/guides/>
23. EURACHEM / CITAC Guide CG 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, third edition (QUAM:2012.P1). https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf
24. SN ENV 13005 Leitfaden zur Angabe der Unsicherheit beim Messen (Ausgabe 2000-07).
25. ISO/TS 19036: 2006/Amd 1: 2009: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guide on estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations (December 2004).
26. *Niemelä, S.I.*: Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms. Advisory Commission for Metrology, MIKES Publication J4/2003. http://www.mikes.fi/documents/upload/J4_2003.pdf
27. CCFRA. Microbiological measurement uncertainty: a practical guide. Guideline G47 (2004).
28. EA-4/16 G:2003 (rev.00). EA Guidelines on the Expression of Uncertainty in Quantitative Testing.

Weiterführende Literatur

29. *Sachs, L.*: Angewandte Statistik. Springer Verlag, Berlin, 13. Auflage 2009. S. 472

30. Pichhardt, Klaus: Lebensmittelmikrobiologie – Grundlagen für die Praxis. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 4. überarb. Aufl. (1998).
31. ISO 17043: Konformitätsbewertung – Allgemeine Anforderungen an Eignungsprüfungen (ISO/IEC 17043:2010).

5. Key words

Guideline, microbiological testing, food-stuffs, validation, measurement uncertainty

Anhang - Übergangsregelung (gültig bis 30.04.2022) für die Methoden des Schweizerischen Lebensmittelbuchs (SLMB)

Seit dem 01.05.2017 kann das SLMB nicht mehr als nationales Standardwerk betrachtet werden. Für die mikrobiologischen Hygieneparameter gelten die in den Verordnungen aufgeführten internationalen Methoden.

Für SLMB–Methoden (nicht ISO), welche bereits im Geltungsbereich der Akkreditierung eines Labors angewendet werden, müssen folgende Leistungskriterien dargelegt werden:

- Der Anwendungsbereich (z. B. Matrix) der Methode ist definiert und dem Labor bekannt.
- Die Leistungsfähigkeit der Methode ist dem Labor – soweit vorhanden - bekannt. Siehe Tabelle 1.
- Das Labor muss an einem Proficiency Test oder - falls nicht verfügbar - einem Laborvergleich erfolgreich teilgenommen haben.
- Wenn externe Vergleiche nicht möglich sind, muss eine laborinterne Präzision (Wiederhol- und allenfalls eine Laborpräzision) bestimmt werden.
- Abschätzung der Messunsicherheit: Grundsätzlich ist bei klassischen mikrobiologischen Methoden +/- 0.5 log anzunehmen (7).

Falls international anerkannte Methoden für die gleiche Aufgabenstellung wie SLMB-Methoden existieren, müssen diese angewendet werden oder die Vergleichbarkeit der Methoden in einer Validierung belegt werden.

* / * / * / * / *