



Bundesamt für
Verbraucherschutz und
Lebensmittelsicherheit

Leitlinien für die Validierung von Spezies- Identifizierungen mittels MALDI-TOF-MS in Einzellaboren oder in Laborverbänden

Arbeitsgruppe § 64 LFGB „MALDI-TOF“



IMPRESSUM

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Weg und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechts.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

© 2021 Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)

Herausgeber:
Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)
Bundesallee 51
38116 Braunschweig

Redaktionsgruppe:
§ 64 LFGB AG „MALDI-TOF“

ViSdP: Harald Händel (BVL, Ref. Presse und Öffentlichkeitsarbeit)

Titelbild: © CVUA-Stuttgart

Leitlinien für die Validierung von Spezies-Identifizierungen mittels matrixunterstützter Laser-Desorptions-/Ionisations- Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) im Einzellabor oder in Laborverbänden

Rau, Jörg^{1*}; Dolch, Lina-Juana²; Eisenberg, Tobias³; Erhard, Marcel⁴; Fuchs, Jannika⁵; Gödecke, Pia⁶; Hilgarth, Maik⁷; Huber, Ingrid⁸; Huschek, Gerd⁹; Neumann, Nadine¹⁰; Mailänder, Matthias¹¹; Pavlovic, Melanie⁸; Stahl, Antje¹²; Wind, Christine¹³; Wittmann, Claudia¹⁴; Becker, René^{15**}

Arbeitsgruppe MALDI-TOF-MS nach § 64 LFGB, koordiniert durch das
Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Berlin (BVL)

* Leitung, weitere Autorinnen und Autoren in alphabetischer Reihenfolge;

** Geschäftsführung

¹ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Stuttgart, Schaflandstr. 3/2, 70736 Fellbach

² Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr-Wupper, Deutscher Ring 100, 47798 Krefeld

³ Landesbetrieb Hessisches Landeslabor, Schubertstr. 60, 35392 Gießen

⁴ RIPAC-LABOR GmbH, Am Mühlberg 11, 14476 Potsdam

⁵ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Karlsruhe, Weißenburger Straße 3, 76187 Karlsruhe

⁶ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Westfalen, Westhoffstraße 17, 44791 Bochum

⁷ Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Technische Universität München, Gregor-Mendel-Straße 4, 85354 Freising

⁸ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

⁹ IGV-Institut für Getreideverarbeitung GmbH, Arthur-Scheunert-Allee 40/41, 14558 Nuthetal

¹⁰ Landeslabor Schleswig-Holstein, Max-Eyth-Straße 5, 24537 Neumünster

¹¹ Lablicate GmbH, Martin-Luther-King Platz 6, 20146 Hamburg

¹² Intertek Food Services GmbH, Olof-Palme-Straße 8, 28719 Bremen

¹³ Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Freiburg, Am Moosweiher 2, 79108 Freiburg

¹⁴ Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern, Thierfelderstraße 18, 18059 Rostock

¹⁵ Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin

Vorwort

Die § 64 LFGB Arbeitsgruppe „MALDI-TOF“ hat Leitlinien für die Durchführung der Validierung von Identifizierungsverfahren mittels der matrixunterstützten Laser-Desorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) im Einzellabor und in Laborverbänden sowie in Ringversuchen erarbeitet. Die MALDI-TOF-MS wird insbesondere als qualitatives Verfahren für die nicht gerichtete Identifizierung (Screening), zur Identifizierung konkreter Parameter sowie als Bestätigungsprüfung für konkrete Parameter genutzt.

Validierungen sollen die Gebrauchstauglichkeit der Methoden für den jeweiligen Anwendungsbereich belegen. Mit diesen Leitlinien wird beabsichtigt, erste Leistungskriterien im Kontext bestehender verwandter Regelungen auf europäischer (CEN) und auf internationaler Ebene (ISO, Codex) festzulegen. Die erarbeiteten Ansätze zur Methodvalidierung sollen in andere relevante Gremien eingebracht werden, um Normen in diesem Bereich aktiv mitzugestalten.

Die in diesem Dokument dargestellte Vorgehensweise stellt eine Empfehlung dar, die sich in der Praxis bei verschiedenen Anwendungen, auch außerhalb der Untersuchung von Lebensmitteln und Futtermitteln, bewährt hat. Alternative Vorgehensweisen sind möglich, wenn belegt werden kann, dass die im Folgenden genannten Leistungskriterien bezüglich der Richtig-positiv-Rate (Inklusivität), der Falsch-negativ-Rate, der Richtig-negativ-Rate (Exklusivität), der Falsch-positiv-Rate, oder – bei Verwendung im Screening – der Korrektklassifikationsrate sowie der Robustheit erreicht werden.

Alle in dieser Leitlinie aufgeführten Handelsnamen oder sich auf einzelne Anbieter beziehende Produktbeschreibungen dienen lediglich als Information zur Unterrichtung der Anwender dieser Leitlinie und bedeuten keine Anerkennung des genannten Produktes durch das BVL.

Inhaltsverzeichnis

1	Prinzip und Anwendungsbereich	7
1.1	Nicht gerichtete Identifizierung (Screening)	7
1.2	Zielgerichtete Identifizierung konkreter Parameter	8
1.3	Bestätigungsprüfung	8
1.4	Grundsätzliche Erwägung	8
2	Arbeitsgang	9
3	Ziel der Validierung – der Parameter	10
4	Kriterien für die Auswahl der Testisolate und Testmaterialien	11
5	Leistungsmerkmale	12
5.1	Richtig-positiv-Rate / Falsch-negativ-Rate	13
5.2	Richtig-negativ-Rate / Falsch-positiv-Rate	14
5.3	Korrektklassifikationsrate	15
5.4	Identifizierungsrate	15
5.5	Robustheit	15
6	Anwendung der Kennzahlen bei der Beurteilung der Verfahren	16
6.1	Nicht gerichtete Identifizierung (Screening)	16
6.2	Zielgerichtete Identifizierung	17
6.3	Bestätigungsprüfung	17
6.4	Allgemeine Hinweise	17
7	Interpretation der Identifizierungsergebnisse	18
8	Erneuerung der Validierung bei veränderter Datenbank	18
9	Ringversuch	18
	Referenzen	20
	Anhang 1: Einstufung der Validität von Vergleichsisolaten und Vergleichsmaterialien	22

Anhang 2: Empfohlene minimale Stichprobengrößen von Ziel-Parameter und Nicht-Ziel-Parameter zur Ermittlung von zu erreichenden Leistungskennzahlen für MALDI-TOF-MS-Anwendungen	23
Anhang 3: Beispiele für Auswertungen von Validierungen.....	24
A3.1: Nicht gerichtete Identifizierung (Screening)	24
<i>Beispiel A3.1.1: Identifizierung von Muskelfleisch auf Speziesebene</i>	24
<i>Beispiel A3.1.2: Identifizierung von Veterinärisolaten</i>	25
A3.2.: Zielgerichtete Identifizierung konkreter Parameter	26
<i>Beispiel A3.2.1: Identifizierung von Staphylococcus aureus</i>	26
<i>Beispiel A3.2.2: Identifizierung von Muskelfleisch von Pferden</i>	28
<i>Beispiel A3.2.3: Identifizierung von Fisch-Muskelfleisch</i>	30
A3.3: Bestätigungsprüfung konkreter Parameter	32
<i>Beispiel A3.3.1: Muskelfleisch: Bestätigung des Parameters Aves (Vögel)</i>	32
Anhang 4: Beispiele für einen Test auf Robustheit	33
Anhang 5: Ablauf einer Validierungsuntersuchung mittels Parallelblindproben.....	34

1 Prinzip und Anwendungsbereich

Mit dem Identifizierungsverfahren der MALDI-TOF-MS werden Masse-Ladungsmuster (Massenspektren) von Biomolekülen (beispielsweise Proteinen) einer Probe erzeugt. Die erhaltenen Massenspektren werden mit in Datenbanken organisierten und taxonomisch (beispielsweise in der Spezies oder im Genus) definierten Referenzmustern verglichen. Durch ein computergestütztes Ranking der besten Übereinstimmung mit Referenzmustern/Massenspektren und der Anwendung von empirischen Entscheidungsregeln erfolgt die Zuordnung der Probe und somit deren Identifizierung. Mit dem hier behandelten Verfahren kann eine Identifizierung der als Probe vorliegenden Materialien nur erfolgen, wenn entsprechende taxonomisch definierte Referenzmuster auch in den Datenbanken enthalten sind.

Die MALDI-TOF-MS kann dabei grundsätzlich für Identifizierungen von verschiedensten organischen Proben geeignet sein, sofern ausreichend spezifische Marker in den vorgelegten Referenzmustern der Datenbank enthalten sind [Rawel *et al.*, 2019]. Methoden zur Identifizierung können beispielsweise für die taxonomische Genus-, die Spezies-, die Subspeziesebene oder einzelne Eigenschaften erarbeitet werden [Patel, 2019; Pavlovic *et al.*, 2015; Rau *et al.*, 2020, Rau *et al.*, 2021; Stahl und Schröder, 2017; Ulrich *et al.*, 2019]. Derartige Anwendungen der MALDI-TOF-MS sind nicht auf die Untersuchung von Lebensmitteln und Futtermitteln beschränkt [Singhal *et al.*, 2015; Rahi *et al.*, 2016; Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2019].

Diese Leitlinien beschreiben minimale Leistungskriterien für identifizierende MALDI-TOF-MS-Methoden, die bei einer Validierung im Einzellabor (unabhängig arbeitendes Labor mit einem Standort) oder im zusammenarbeitenden Laborverbund (mehrere Standorte, definierte Arbeitsgemeinschaft, gemeinsamer Pool an Referenzspektren und/oder Validierungsspektren) zu berücksichtigen sind. Im Folgenden werden Einzellabor- und Laborverbund als „Labor“ bezeichnet.

Durch laborinterne oder/und zwischen Laboratorien durchgeführten Studien zur Validierung unter Anwendung dieser Leitlinie steht die entsprechende Methode im amtlichen Labor im Einklang mit Art. 34 der VO (EU) 2017/625.

Die ermittelten Validierungsdaten sollen helfen zu entscheiden, ob und wie die betreffenden Methoden in einem Ringversuch validiert werden können und in die Amtliche Methodensammlung des BVL aufgenommen werden sollen.

Die Ergebnisse der Validierung sind im Labor eine wichtige Grundlage zur Beurteilung der Gebrauchstauglichkeit für den vorgesehenen Zweck. Validiert wird daher der/die Ziel-Parameter (ggf. Zielgruppe) in seiner/ihrer üblichen Anwendung im konkreten Labor (beispielsweise *Staphylococcus aureus* bei Isolaten; Tierart Büffel bei Mozzarella).

Aus dem jeweiligen Zweck leitet sich die Vorgehensweise der Validierung einer MALDI-TOF-MS-Methode ab:

1.1 Nicht gerichtete Identifizierung (Screening)

Die Validierung einer nicht gerichteten Identifizierung (Screening) überprüft, ob die beabsichtigten Ziel-Parameter in der großen taxonomischen Bandbreite richtig erfasst werden (beispielsweise die Identifizierung von Mikroorganismen aus der eigenen Laborpraxis mit einer kommerziellen Datenbank, welche um eigene Referenzeinträge ergänzt wurde).

1.2 Zielgerichtete Identifizierung konkreter Parameter

Die Validierung einer (ziel-)gerichteten identifizierenden MALDI-TOF-MS-Methode zielt auf eine einzelne, konkrete Identifizierungsentscheidung (**Ziel-Parameter**; z. B. einer Mikroorganismen-Spezies, einer Tierart oder einer Pilz-Gattung) ab.

Anmerkung: Die Begriffe „Ziel-Parameter“ und „Nicht-Ziel-Parameter“ werden in Analogie zu „Zielstamm“ und „Nicht-Zielstamm“ im Sinne der DIN-EN-ISO 16140-1 verwendet.

Es werden hierbei nur gelungene Identifizierungsentscheidungen berücksichtigt. Nicht identifizierte Proben sind als solche erkennbar und beeinflussen den Anteil der richtig positiven an der Gesamtheit der identifizierten Proben nicht. Validiert wird der/die Ziel-Parameter in seiner/ihrer üblichen Anwendung im konkreten Labor (beispielsweise *Staphylococcus aureus* bei Isolaten; Tierart Büffel bei Mozarella).

1.3 Bestätigungsprüfung

Auch die Validierung einer bestätigenden MALDI-TOF-MS-Methode zielt auf eine einzelne, konkrete Identifizierungsentscheidung (**Ziel-Parameter**) ab. Bei einer Bestätigungsprüfung soll für den Parameter auch im negativen Fall eine eindeutige Aussage möglich sein. Daher werden nicht identifizierte Proben des Parameters konsequent als falsch negativ gewertet (beispielsweise *Staphylococcus aureus* bei Isolaten aus Lebensmitteln).

1.4 Grundsätzliche Erwägung

Die zur Validierung verwendeten MALDI-TOF-Massenspektren müssen bei allen Zwecken bestimmte Grundanforderungen an die technische Qualität und die Dokumentation erfüllen. Diese sind geräte- bzw. systemspezifisch und werden von den Geräteherstellern vorgegeben. Die Einhaltung dieser Vorgaben wird vorausgesetzt.

Es können Massenspektren anderer Nutzer, die außerhalb des eigenen Labors erzeugt wurden, in die Validierung einbezogen werden. Dies setzt voraus, dass diese externen Massenspektren dieselben Grundanforderungen an die technische Qualität und Transparenz der Dokumentation erfüllen. Mit einem solchen nutzerübergreifenden Ansatz kann die zur robusten Validierung erforderliche Anzahl an Proben im Labor leichter erreicht werden. Auch zeigt sich die Übertragbarkeit der Ergebnisse so in einfacher Weise. Eine Möglichkeit ist hier der Austausch über die MALDI-User Plattform MALDI-UP [Rau *et al.*, 2016a].

In der Mikrobiologie schließt sich die MALDI-TOF-MS in der Regel den kulturellen Methoden mit der Identifizierung von reinen Isolaten an, die beispielsweise auf Fest- oder in Flüssigmedien kultiviert wurden. MALDI-TOF-MS wird für eine nicht gerichtete oder eine zielgerichtete Identifizierung eingesetzt oder sie übernimmt im Arbeitsgang die Aufgabe einer Bestätigungsprüfung. So kann die Technik in der Lebensmittel- und Futtermittelmikrobiologie Teil eines Gesamtverfahrens im Sinne der DIN-EN-ISO 16140-4 zur Bestätigung konkreter Ziel-Parameter sein.

Bei pflanzlichen oder tierischen Proben sind insbesondere wenig oder nicht verarbeitete, in der Spezies reine Produkte für die direkte Spezieserkennung per MALDI-TOF-MS geeignet.

Liegen für konkrete MALDI-TOF-MS-Anwendungen zertifizierte Validierungen vor, beispielsweise vom Gerätehersteller, ist im Labor anstelle einer Validierung lediglich eine angepasste Verifizierung erforderlich. Bei Mikroorganismen sollte sich die Prüfung im Labor für das MALDI-TOF-MS-Verfahren in

der Stichprobe an den Vorgaben der ISO 16140-3 orientieren, d. h. mindestens 5 Stämme des Ziel-Parameters sowie 5 Stämme des Nicht-Ziel-Parameters umfassen.

Es wird empfohlen, validierte Methoden regelmäßig durch die Teilnahme an geeigneten Eignungsprüfungen zu überprüfen.

2 Arbeitsgang

Arbeitsabläufe für identifizierende MALDI-TOF-MS-Verfahren bestehen aus mehreren Teilschritten, die auf das Ergebnis Einfluss haben können:

Je nach Aufgabenstellung können verschiedene **Aspekte der Probenart** das Ergebnis der Identifizierung beeinflussen. Beispielsweise sollten bei Mikroorganismen unterschiedliche spektrometrische Phänotypen in Abhängigkeit der Probenherkunft oder bei Tierarten unterschiedliche technologische Verarbeitungszustände berücksichtigt werden.

Mikroorganismen werden in der Regel vor der Analyse kultiviert. Die **Kulturbedingungen** können dabei Einfluss auf die Zusammensetzung der in der MALDI-TOF-MS analysierten Makromoleküle und somit auf das Massenspektrum haben. Die für die Anwendung im Labor relevanten Varianten der Kulturbedingungen wie das Nährmedium und die verwendeten physikalischen Varianten (Zeit, Temperatur, Zusammensetzung der Gasphase, Bewegung des Mediums bei der Anzucht, Beleuchtung) werden im Validierungsplan berücksichtigt, um die im Labor benötigte Robustheit des Verfahrens zu belegen. Gegebenenfalls müssen sinnvolle Anwendungsgrenzen festgelegt werden, welche die validierten Bedingungen beschreiben. Ein Beispiel dafür ist die Begrenzungen der Kultivierungszeit für sporenbildende Bakterien.

Die für die Anwendung im Labor relevanten Varianten der **Probenpräparation** und **-extraktion** werden im Validierungsplan als Robustheitstest ausreichend berücksichtigt.

Bei Einhaltung der Protokolle der Gerätehersteller für Kalibration und Probenvorbereitung sowie der empfohlenen Geräteparameter und der Wartungsempfehlungen sind **günstige Geräteparameter** für die Messung der Standardanwendungen bereits gegeben. Auch die Häufigkeit der Kalibration, der Überprüfung des Detektors, der Reinigung der Ionenquelle sowie des Wartungsturnus sollten den jeweiligen Geräteherstellerempfehlungen folgen. Dies sind grundsätzlich wichtige technische Voraussetzungen für eine gute Qualität der Massenspektren. Relevante technische Einstellungen beeinflussen dabei beispielsweise die Anzahl der Peaks, das Signal-Rausch-Verhältnis, sowie die Auflösung und haben entscheidenden Einfluss auf die Richtig-positiv-Rate.

Zur Gewährleistung der Massengenauigkeit ist eine regelmäßige Massenkalkulation des Systems mit einem geeigneten Standard erforderlich. Für Mikroorganismen wird hierzu oft eine aktuelle Mehrpunkt-Kalibrierung mit mindestens fünf bekannten Massen, z. B. durch eine auf *E. coli* basierende Präparation, im betrachteten Massenfenster durchgeführt. Der Turnus der Kalibration ist festzulegen. Hierzu kann beispielsweise die messtägliche Überprüfung mit einem bekannten Isolat oder Material dienen, welches mit dem Kalibrierungsmaterial identisch sein kann. Das zur Auswertung verwendete **Massenfenster** für die jeweilige Anwendung ist zu definieren. Diese vorgenannten Einstellungen werden für Standardanwendungen der Mikrobiologie üblicherweise bereits von den Geräteherstellern vorgeschlagen. Durch entsprechende Aufzeichnungen der messtäglichen Überprüfung im Sinne einer Kontrollkarte kann die einwandfreie Gerätefunktion vor der eigentlichen Probemessung belegt werden.

Die für die jeweilige Anwendung genutzte **Referenzdatenbank** ist entscheidend für das Gelingen der korrekten Identifizierung. Referenzdatenbanken liefern eine Vielzahl möglicher Ergebnisse für die

Identifizierung, welche bei umfangreichen Datenbanken nicht in ihrer Gesamtheit im Labor validiert werden können. Referenzdatenbanken unterliegen zudem einer schrittweisen Weiterentwicklung, beispielsweise durch Erweiterung um neue Spezies oder durch Anpassungen an die aktuelle Taxonomie. Änderungen der Datenbank erfolgen beispielsweise durch Updates der Gerätehersteller oder werden durch vom Anwender selbst initiierte Ergänzungen der Datenbank ausgelöst. Die Überprüfung des gesamten Systems, bestehend aus dem Gerät und der durch die schrittweisen Weiterentwicklungen agilen Gesamtdatenbank, erfordert daher eine besonders flexible Validierungsstrategie.

Eine formelle Validierung überprüft eine konkrete Version/einen konkreten Stand der genutzten Referenzdatenbank, bezogen auf einen Ziel-Parameter im Laborumfeld. Die jeweils zur Validierung verwendete Datenbank ist in gelenkter Form zu dokumentieren.

Die **Auswerteprogramme**, die **Auswertemethode** und die **Entscheidungsregeln** der Identifizierung (beispielsweise über einen Übereinstimmungsgrad der Probe mit den ähnlichsten Treffern in der Datenbank) werden oft bereits von den Geräteherstellern vorgeschlagen, können aber auch selbst festgelegt und modifiziert werden. Beispiele hierfür sind die Festlegung herstellerunabhängiger Entscheidungsgrenzen für die sichere Identifizierung oder Abstandskriterien. Die für die jeweilige Validierung verwendeten Programme zur Auswertung, die Auswertemethode und die Entscheidungsregeln sind Bestandteil der Methodik und somit der Dokumentation der Validierung.

Für die Validierung agiler Datenbanken, also Datenbanken welche sich schrittweise durch Anpassungen der Referenzeinträge im Inhalt ändern (beispielsweise durch neue Versionen), kann eine dauerhafte Sammlung von Einzelspektren (Testdatensatz) sicher benannter und gut dokumentierter mikrobieller Isolate oder anderer Probenmaterialien dienen.

Die zur Überprüfung eingesetzten Isolate oder andere Probenmaterialien werden vor der Verwendung nach der Vertrauenswürdigkeit ihrer Benennung eingestuft. Diese Einstufung erfolgt nach Bewertung aller zum Isolat/Material vorliegenden Informationen. Für die systematische Einstufung der Benennungen nach ihrer Vertrauenswürdigkeit kann eine Tabelle der Kriterien hilfreich sein (Anhang 1) [Rau et al., 2016b].

3 Ziel der Validierung – der Parameter

Im ersten Schritt sollte/n im Kontext der Aufgabenstellung der/die Parameter festgelegt werden, für den/die im Labor ein validiertes Ergebnis mittels MALDI-TOF-MS gewünscht ist. Der Validierungsplan berücksichtigt dabei im ersten Schritt die vorgesehene Anwendung:

Die Validierung der Identifizierung konkreter Parameter (im Sinne eines Bestätigungsverfahrens) erfordert dabei eine andere Vorgehensweise als der Einsatz zur nicht gerichteten Identifizierung.

Für den Validierungsplan sollten alle im Routineablauf des Labors verwendeten und vorgesehenen Vor- und Messbedingungen ausreichend berücksichtigt werden. Im Labor ggf. benötigte Freiheitsgrade bezüglich der **Aspekte der Probenart**, der Inkubation, der Probenpräparation oder anderer Art werden über die Integration entsprechender Messungen berücksichtigt. Hierdurch kann die Robustheit beurteilt werden.

Parameter kann jede taxonomische Stufe (beispielsweise: Familie, Genus, Spezies, Subspezies, spezielle Gruppe unterhalb der Speziesebene, Träger bestimmter Eigenschaften) sein. Die Aufgabenstellung des Labors ergibt sich aus den zu bearbeitenden Probenarten (beispielweise: Mikroorganismen aus Lebensmitteln, Fischmuskelfleisch für den menschlichen Verzehr).

Beispiele für Parameter:

- L 00.00-166, Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Cronobacter spp.*, modifiziert (Bestätigung mittels MALDI-TOF-MS)
- Identifizierung von *Staphylococcus aureus* Isolaten aus Lebensmitteln und Proben der veterinärmedizinischen Diagnostik (Eutergesundheit, allgemeine Bakteriologie) [Rau *et al.*, 2016b]
- Identifizierung der Tierart Pute (*Meleagris gallopavo*) aus Muskelfleisch für den menschlichen Verzehr
- Identifizierung der Tierart bei Fischrogen und -zubereitungen für den menschlichen Verzehr
- Identifizierung von Zelllinien

4 Kriterien für die Auswahl der Testisolate und Testmaterialien

Zur Validierung einer Identifizierungsentscheidung für einen Parameter mittels einer bestehenden Datenbank-Version sollte die Zuverlässigkeit der Zuordnung ermittelt werden. Dabei werden Identifizierungsergebnisse von Referenzmaterial oder Referenzdatensätzen gegen ihre Grundwahrheit verglichen.

Für die Bestimmung der Richtig-positiv-Rate bzw. der falsch-negativ -Rate wird eine ausreichende Zahl (Stichprobe) an unabhängigen Isolaten bzw. Materialien des Ziel-Parameters benötigt. Zur Ermittlung der Richtig-negativ-Rate bzw. der Falsch-positiv-Rate wird eine sinnvolle Gegengruppe (die „Nicht-Ziel-Parameter“) in ebenfalls ausreichender Zahl benötigt. Deren Zusammensetzung leitet sich aus der Probenart und dem analytischen sowie dem taxonomischen Umfeld der Untersuchung ab. Die Zahl der für Ziel-Parameter und Gegengruppe notwendigen unabhängigen Isolate bzw. Materialien ist abhängig von dem Zweck der Validierung (s. Anhang 2).

Anmerkung: Für mikrobiologische Parameter kann sich die Auswahl der Prüfstämme (Ziel- und Nicht-Ziel-Parameter) nach den Kriterien aus DIN EN ISO 16140-6:2020-04, Kap. 6.2 richten.

Unter Berücksichtigung des beabsichtigten Anwendungsbereiches der Methode sollen die zur Validierung eingesetzten Isolate/Materialien vorzugsweise aus den für das Labor üblichen Untersuchungsmatrizes stammen (z. B. Lebensmittel, Futtermittel, Umgebung von Herstellung oder Primärproduktion von Lebensmitteln).

Diese Isolate bzw. Materialien müssen in ihrer Identität bekannt sein. Sie können aus gut dokumentierten Referenzsammlungen stammen. Andere Materialien (beispielsweise eigene Isolate) müssen unabhängig von der MALDI-TOF-MS mit einem anerkannten, die Zuordnung belegenden Verfahren bestätigt sein. Je nach beabsichtigtem Ziel der Validierung können hierfür verschiedene Informationen (biochemische, genetische, serologische, anatomische etc.) berücksichtigt werden. Aus der vorhandenen Informationsdichte erfolgt günstiger Weise eine Klassifizierung der Benennung des Isolates/Materials nach definierten Kriterien (Beispiel s. Anhang 1). Die Grundlage der Benennung des Isolates/Materials wird transparent und nachvollziehbar dokumentiert. Dies erleichtert die Neubewertung, beispielsweise bei einer sich ändernden Taxonomie. Es ist dabei sinnvoll die verwendeten Materialien in geeigneter Form einzulagern, um zukünftige Untersuchungen zu ermöglichen.

Aus den Isolaten/Materialien ist ein Satz MALDI-TOF-Massenspektren (Testdatensatz) so zu erzeugen, wie sie im üblichen Arbeitsgang des Labors erstellt werden. Aufgrund der möglichen Variation der Probenpräparation und -vorbereitung sind Mehrfachmessungen sinnvoll. Ist eine eskalierende

Kaskade der Probenpräparationen im Labor üblich (z. B. Direkttransfer = Schmierpräparation im ersten Versuch bis hin zur Ethanol-Ameisensäure-Extraktion im letzten Versuch) sollte diese auch im Validierungsexperiment eingesetzt werden. Von dem konkreten Testmaterial (Isolat x) wird das Spektrum mit der besten Zuordnung („best hit“) in die Statistik eingebracht.

Abhängig von der gewünschten statistischen Sicherheit für die Identifizierung und dem gewählten Zweck der Anwendung – als Bestätigungsmethode, für eine konkrete Identifizierungsentscheidung oder für die nicht gerichtete Identifizierung – kann die Stichprobengröße geplant werden (s. Anhang 2). Dazu werden unabhängige Spektren verschiedener Proben (Isolate, Materialien) des „Ziel-Parameters“ sowie der „Nicht-Ziel-Parameter“ als Stichprobe verwendet.

Für Validierungen können neben eigenen auch transparent und valide dokumentierte Probenspektren anderer MALDI-TOF-Nutzer eingesetzt werden, wenn die Kompatibilität mit dem Messsystem des eigenen Labors gegeben ist und die Metadaten die Zuordnung der Validierungsspektren zum Parameter nachvollziehbar belegen.

Bei der Verwendung externer Spektren sollten mindestens ein Fünftel eigene unabhängige Spektren des Parameters sowie ein Fünftel der Spektren der Gegengruppe in Relation zur Mindestzahl (s. Anhang 2) im Labor selbst aufgenommen worden sein.

Es wird empfohlen, Vergleichsisolate und -materialien mit ihrer Speziesbezeichnung und einer identifizierenden Codierung (z. B. der eigenen Nummer der internen Isolatesammlung, der Nummer einer öffentlichen Stammsammlung, der Nummer eines externen Einsenders etc.) zu führen.

5 Leistungsmerkmale

Grundsätzlich sind für identifizierende MALDI-TOF-MS-Methoden in der Validierung folgende Leistungsmerkmal-Daten zu für Labore ermitteln:

Für die nicht gerichtete Identifizierung (das Screening) wird eine zusammenfassende **Korrektklassifikationsrate** benötigt, welche als Maß für die Gebrauchstauglichkeit der in der Methode verwendeten Datenbank für die im Labor benötigten Ziel-Parameter dient.

Für die zielgerichtete Identifizierung konkreter Parameter sowie die Bestätigungsprüfung werden zur Validierung des Ziel-Parameters die **Inklusivität** (die Richtig-positiv-Rate), die **Exklusivität** (die Richtig-negativ-Rate), sowie die **Falsch-positiv-Rate** und die **Falsch-negativ-Rate** ermittelt.

Zur Beurteilung der **Robustheit** werden bei Bedarf übliche Variationen der Methode identifiziert und in die Validierung integriert.

Anhand der o.g. Daten kann beurteilt werden, ob für diese Leistungsmerkmale die minimal erforderlichen Leistungskriterien erfüllt werden und ob eine Methodvalidierung in einem Ringversuch durchgeführt werden kann.

Die zur Ermittlung zu Grunde liegende jeweilige Stichprobengröße n bzw. m für die experimentelle Überprüfung ist anzugeben.

5.1 Richtig-positiv-Rate / Falsch-negativ-Rate

Die **Richtig-positiv-Rate (RPR)** ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass eine bekanntlich positive Probe (hier Isolat oder Material) durch die Methode als positiv klassifiziert wird (positiv übereinstimmende Proben, PA). Somit zeigt sie die Eignung der Methode, den Analyten richtig nachzuweisen (Maß der spezifischen Erfassung, **Inklusivität**).

$$RPR = \left(\frac{\Sigma PA}{n} \right) \times 100\%, (n)$$

RPR = Richtig-positiv-Rate in %

ΣPA = Anzahl der richtig-positiv gewerteten Spektren = Anzahl der positiven Übereinstimmungen

n = Anzahl an zur Validierung eingesetzten Probenspektren des Ziel-Parameters

Die **Falsch-negativ-Rate (FNR)** ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass eine bekanntlich positive Untersuchungsprobe durch die Methode als negativ klassifiziert wird (Negativabweichung, ND).

$$FNR = \left(\frac{\Sigma ND}{n} \right) \times 100\%, (n)$$

FNR = Falsch-negativ-Rate in %

ΣND = Anzahl der falsch-negativ gewerteten Spektren = Anzahl der negativen Abweichungen

n = Anzahl an zur Validierung eingesetzten Probenspektren des Ziel-Parameters

Die Überprüfung von **Richtig-positiv-Rate** und **Falsch-negativ-Rate** erfolgt an einer ausreichend großen Stichprobe (n) von Isolaten oder Materialien, die bezüglich des Ziel-Parameters bekanntlich positiv sind. Dabei können auch Stämme/Materialien eingesetzt werden, für die in der Datenbank Referenzen hinterlegt sind, solange die Spektren des Testdatensatzes unabhängig (andere Präparation) vom Erstellungsprozess der Referenzspektren erzeugt wurden.

Bei der Auswahl sollten Isolate und Materialien aus den Probenarten/Matrizes integriert werden, die in der Praxis des Labors relevant sind (z. B. „*Staphylococcus aureus* aus Lebensmitteln“ oder „Proben der veterinärmedizinischen Bakteriologie“). Sofern hierzu Daten verfügbar sind, ist es sinnvoll diese in die Auswahl verschiedene Varianten des Ziel-Parameters einzuschließen (beispielsweise bei Mikroorganismen-Serotypen, Biotypen, morphologische Varianten, Tierrassen). Die Auswahl kann durch Stämme aus öffentlichen Stammsammlungen oder Isolate/Materialien aus anderen Matrizes ergänzt werden.

Da die MALDI-TOF-MS eine spektrometrische, phänotypische Methode ist, ist eine Validierung alleinig mit Spektren aus Referenzstämmen nicht immer ausreichend, um die in den beabsichtigten Untersuchungsproben vorkommende Varianz an aktueller spektraler Phänotypie zu berücksichtigen.

Für die Ermittlung der Richtig-positiv-Rate und der Falsch-negativ-Rate werden MALDI-TOF-Massenspektren von bekanntlich positiven Untersuchungsproben verwendet, die mit einer oder mehreren geeigneten Methoden erstellt wurden. Diese Spektren werden mit der im Labor verwendeten Datenbank-Version identifiziert. Aus dem Anteil der richtig zum Parameter zugeordneten Spektren an der Gesamtzahl der als positiv erwarteten Spektren wird die Richtig-positiv-Rate berechnet.

Aus dem Anteil der fälschlich nicht zum Parameter zugeordneten Spektren an der Gesamtzahl der als positiv erwarteten Spektren wird die **Falsch-negativ-Rate** berechnet. Bei Validierungen für die Identifizierung werden nicht identifizierte Proben nicht (als falsch-negativ) gewertet. Bei der Validierung zur

Bestätigung gelten dagegen auch nicht identifizierte bekanntlich positive Untersuchungsproben als nicht erkannt und sind somit als falsch-negativ zu werten.

5.2 Richtig-negativ-Rate / Falsch-positiv-Rate

Die **Richtig-negativ-Rate (RNR)** ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass eine bekanntlich negative Untersuchungsprobe durch die Methode als negativ klassifiziert wird (Ausschlussicherheit, **Exklusivität**) [DIN-EN-ISO 16140-1]. Die Richtig-negativ-Rate zeigt die Eignung einer Methode nur einen bestimmten Analyten zu erfassen.

$$RNR = \left(\frac{\Sigma NA}{m} \right) \times 100\%, (m)$$

RNR = Richtig-negativ-Rate in %

ΣNA = Anzahl der richtig-negativ gewerteten Spektren = Anzahl der negativen Übereinstimmungen

m = Anzahl an zur Validierung eingesetzten Probenspektren der Nicht-Ziel-Parameter

Die **Falsch-positiv-Rate (FPR)** gibt die falsch dem Parameter zugeordneten Spektren (Positivabweichung, PD) an der Gesamtzahl der als negativ erwarteten Spektren an.

$$FPR = \left(\frac{\Sigma PD}{m} \right) \times 100\%, (m)$$

FPR = Falsch-positiv-Rate in %

ΣPD = Anzahl der falsch-positiv gewerteten Spektren = Anzahl der positiven Abweichungen

m = Anzahl an zur Validierung eingesetzten Probenspektren der Nicht-Ziel-Parameter

Die Ermittlung von **Richtig-negativ-Rate** und **Falsch-positiv-Rate** erfolgt an einer ausreichend großen Zahl (*m*) hinsichtlich des Parameters bekanntlich negativer Isolate oder Materialien (Negativkontrollen; „Nicht-Ziel-Parameter“).

Die Auswahl der Negativkontrollen sollte sich an der Verwechselbarkeit mit dem Parameter orientieren: Die Verwechselbarkeit kann sich aus der taxonomischen Verwandtschaft ergeben. Die Auswahl und Anzahl der Spezies sollte die nächsten in der Probenart vorkommenden taxonomischen Verwandten umfassen. Auch in den beabsichtigten Untersuchungsproben häufig vorkommende andere Spezies oder solche mit Verwechslungspotential durch die Probenart sind mit zu prüfen. Die Auswahl kann durch definierte Stämme aus öffentlichen Stammsammlungen oder Isolaten aus anderen Matrices ergänzt werden.

Für die Ermittlung der Richtig-negativ-Rate und der Falsch-positiv-Rate werden MALDI-TOF- Massenspektren von bekanntlich negativen Untersuchungsproben (Negativkontrollen) verwendet, die mit einer/mehreren geeigneten Präparationsmethode/n erstellt wurden. Diese Spektren werden mit der im Labor verwendeten Datenbank-Version identifiziert. Aus dem Anteil der richtigerweise nicht dem Parameter zugeordneten Spektren an den gesamten, bezüglich des Parameters als negativ erwarteten Spektren wird die Richtig-negativ-Rate berechnet. Aus dem Anteil der fälschlich zum Parameter zugeordneten Spektren an der Gesamtzahl der als negativ erwarteten Spektren wird die Falsch-positiv-Rate berechnet.

5.3 Korrektklassifikationsrate

Anhand der ermittelten Daten zu Übereinstimmung und Abweichung lässt sich die übergreifende **Korrektklassifikationsrate (KKR)** ermitteln. Diese Kennzahl gibt die Summe der richtig klassifizierten Ergebnisse (richtig-positiv und richtig-negativ) über die Gesamtheit der Messergebnisse an [Trevethan *et al.*, 2017].

Diese Korrektklassifikationsrate ist für die nicht gerichtete Identifizierung (Screening) zur generellen Überprüfung umfänglicher Referenzdatenbanken geeignet.

$$KKR = \frac{\sum PA + \sum NA}{\sum PA + \sum NA + \sum PD + \sum ND} \times 100 \%$$

KKR = Korrektklassifikationsrate in %

$\sum PA$ = Anzahl der richtig-positiv gewerteten Spektren = Anzahl der positiven Übereinstimmungen

$\sum NA$ = Anzahl der richtig-negativ gewerteten Spektren = Anzahl der negativen Übereinstimmungen

$\sum PD$ = Anzahl der falsch-positiv gewerteten Spektren = Anzahl der positiven Abweichungen

$\sum ND$ = Anzahl der falsch-negativ gewerteten Spektren = Anzahl der negativen Abweichungen

5.4 Identifizierungsrate

Die **Identifizierungsrate (IDR)** des jeweiligen Parameters, d.h. das Verhältnis der identifizierten Proben zu allen untersuchten Proben, kann separat bei allen vorgenannten Anwendungen der Validierung ausgewiesen werden.

$$IDR = \left(\frac{\sum ID}{n} \right) \times 100 \%, (n)$$

IDR = Identifizierungsrate in %

$\sum ID$ = Anzahl der Spektren mit Identifizierungsergebnis des Ziel-Parameters

n = Anzahl an zur Validierung eingesetzten Probenspektren des Ziel-Parameters

5.5 Robustheit

Die Robustheit ist ein Maß für die Belastbarkeit einer Methode durch Veränderungen der Umgebung oder der Durchführungsbedingungen. Zur Bestimmung der Robustheit der MALDI-TOF-MS-Methode werden empirische Daten hinsichtlich potentiell in der Routine auftretender Variationen von Durchführungsbedingungen bewertet. Entsprechend können Variationen im Rahmen der Validierung künstlich hergestellt werden.

In der **Mikrobiologie** ist die Variation der Durchführungsbedingungen der Kultur für den zu identifizierenden Parameter im Labor üblicherweise klein. Variationen umfassen dabei insbesondere kulturelle Bedingungen (Nährmedium, Inkubationstemperatur und -zeit, Atmosphäre). In umfangreichen Studien wurde für MALDI-TOF-MS bereits umfassend belegt, dass kulturelle Bedingungen nur wenig Einfluss auf die Interpretation der Identifizierungen haben [Reich *et al.*, 2013, Wieme *et al.*, 2014].

Variationen der Probenpräparationsprotokolle können dagegen einen Einfluss auf die Richtig-positiv-Rate haben. Oftmals wird bereits in der Methodenbeschreibung eine eskalierende Abfolge von Probenpräparationsprotokollen vorgeschlagen: Wird mit einer einfacheren Probenaufarbeitung (z. B. dem

Direkttransfer) keine eindeutige Identifizierung erreicht, wird systematisch die aufwändigere Probenvorbereitung ausgelöst (z. B. eine Ethanol-Ameisensäure-Extraktion) [Rau *et al.*, 2016b].

In den Validierungsplan des Labors fließen daher die für den Parameter verwendeten Varianten der Kultur und der Probenpräparation ausreichend ein. Die Erfahrung aus diesen Robustheitstests können ggf. als einschränkende Regel für die Methode definiert werden (beispielsweise: *Listeria monocytogenes* Identifizierung nach Ethanol-Ameisensäure-Extraktion).

Bei der Speziesidentifizierung von **tierischen** und **pflanzlichen Lebensmitteln, Lebensmitteln aus Pilzen** oder **Futtermitteln** sind für die jeweilige Produktgruppe diejenigen typischen und technologischen Verfahren zu berücksichtigen, die bei dem zu untersuchenden Probenspektrum des Labors auch erwartet werden. Diese können z. B. Einfrieren, Erhitzungsverfahren oder andere Zubereitungsmethoden umfassen. Es sind für jeden zu überprüfenden Faktor jeweils mindestens drei unabhängige Proben der Produktgruppe zu untersuchen [Rau *et al.*, 2021]. Ein Beispiel für die Durchführung ist im Anhang 4 angegeben.

Sofern möglich, können Vergleichsbedingungen oder verschiedene Intermediär-Bedingungen der Messungen durch Einzelspektren unterschiedlicher Bearbeiter, Standorte, Messsysteme von demselben Material (z. B. Referenzstamm) oder ähnlichen Isolaten/Materialien derselben Spezies zusammengetragen werden. Diese Art der Spektren-Sammlung geht über das eigene Labor hinaus.

6 Anwendung der Kennzahlen bei der Beurteilung der Verfahren

Es erfolgen in Anhang 2 Festlegungen der Mindestanforderungen für die *RPR*, die *FNR*, für die *RNR* und die *FPR* (bzw. die *KKR*) jeweils für die beabsichtigte Anwendung der MALDI-TOF-MS. Zudem sind hier die Mindestanzahlen der zur Validierung eingesetzten Probenspektren (Stichproben) angegeben.

Für alle folgenden Arten der Validierung sind im Anhang 3 Beispiele wiedergegeben.

6.1 Nicht gerichtete Identifizierung (Screening)

Bei der nicht gerichteten Identifizierung (**Screening**) werden für die Berechnung nur gelungene Identifizierungsentscheidungen des MALDI-TOF-MS-Systems als Stichprobe berücksichtigt. Somit zeigt sich in der experimentellen Überprüfung der Anteil der mit dem Verfahren richtig identifizierten Materialien/Isolate des Ziel-Parameters (Richtig-identifiziert-Rate), bezogen auf alle identifizierten Proben.

Für die nicht gerichtete Identifizierung wird die Korrekturklassifikationsrate als umfassende Kennzahl angegeben. Werte der *KKR* ≥ 90 % sind bei einer Mindeststichprobe von $n + m = 500$ ausreichend.

Für einige spezielle Anwendungen ist die Zahl der Analysenspektren eingeschränkt. In Folge dessen weisen die verwendeten Datenbanken nur eine kleinere Zahl relevanter zu überprüfender Referenzspektren auf. In diesen Fällen kann die Mindeststichprobengröße für die Validierung einer nicht gerichteten Identifizierung auch einen angepassten geringeren Umfang aufweisen. Eine Orientierung bieten hier die unter der zielgerichteten Identifizierung konkreter Parameter (6.2) beschriebenen Stichprobengrößen.

Die für das Screening beabsichtigten Parameter müssen in der experimentellen Überprüfung in sinnvoller Gewichtung vertreten sein. Mit der *KKR* wird die generelle Abdeckung des MALDI-TOF-MS-Systems für die vorgesehene Anwendung demonstriert.

6.2 Zielgerichtete Identifizierung

Bei der **zielgerichteten Identifizierung konkreter Parameter** werden für die Berechnung nur gelungene Identifizierungsentscheidungen des MALDI-TOF-MS-Systems als Stichprobe berücksichtigt. Somit zeigt sich in der experimentellen Überprüfung der Anteil der mit dem Verfahren richtig identifizierten Materialien/Isolate des Ziel-Parameters (Richtig-identifiziert-Rate), bezogen auf alle identifizierten Proben.

In der experimentellen Überprüfung der zielgerichteten Identifizierung soll für den Parameter der Wert für die $RPR \geq 95,0 \%$, der $RNR \geq 99,0 \%$ und die Werte für die FNR und die $FPR \leq 1,0 \%$ erreicht werden. Eine RPR unter 95% hat Einschränkungen in der Interpretierbarkeit der zielgerichteten Identifizierung zur Folge. In diesen Fällen kann beispielsweise festgelegt werden, dass zusätzlich zur MALDI-TOF-MS-Identifizierung noch eine weitere Absicherung durch eine andere geeignete Methode notwendig ist.

6.3 Bestätigungsprüfung

Bei der den Ziel-Parameter bestätigenden Untersuchung (**Bestätigungsprüfung**) werden für die Berechnung die Identifizierungsentscheidungen aller Proben als Stichprobe berücksichtigt. Nicht identifizierte Proben des Parameters werden hierbei als falsch-negativ gewertet. Somit zeigt sich in der experimentellen Überprüfung der Anteil der mit dem Verfahren richtig identifizierten Materialien/Isolate des Ziel-Parameters, bezogen auf alle Proben.

In der experimentellen Überprüfung einer bestätigenden Untersuchung sollen für die Identifizierung des Parameters die Werte für die $RPR \geq 98,0 \%$, die $RNR \geq 99,0 \%$ und für die FNR und die $FPR \leq 1,0 \%$ erreicht werden (Anhang 2).

Die für die Überprüfung eines Ziel-Parameters mindestens geforderten Stichprobengrößen an unabhängigen Spektren des Ziel-Parameters und der Nicht-Ziel-Parameter werden in Anhang 2 angegeben.

Das Ergebnis kann bei Einhaltung der Kennwerte der RPR und der FPR ohne weitere Absicherung verwendet werden. Eine RPR unter 98% hat Einschränkungen in der Interpretierbarkeit zur Folge. In diesen Fällen kann beispielsweise festgelegt werden, dass zusätzlich zur MALDI-TOF-MS-Identifizierung noch eine weitere Absicherung durch eine andere geeignete Methode notwendig ist.

6.4 Allgemeine Hinweise

Sollte durch die Validierung nachgewiesenermaßen die Gefahr einer falschen Identifizierung bestehen, beispielsweise bei taxonomisch nah verwandten Spezies, ist dies bei der Dokumentation der Validierung darzustellen. Analog den Herstellerhinweisen, ist diese Verwechslungsgefahr bei der Identifizierungsentscheidung für den definierten Ziel-Parameter zu berücksichtigen. Die Verwendung eines alternativen Verfahrens wird in diesem Fall nahegelegt.

Können taxonomisch verwandte Spezies nicht sicher unterschieden werden, bietet sich eine Änderung der Definition des Parameters auf eine taxonomisch höher liegende Hierarchie-Ebene an. Beispiel: anstelle „*Bacillus thuringiensis*“ und „*Bacillus cereus*“ als konkrete Einzelparameter wird der übergreifende Parameter „präsumtive *Bacillus cereus*“ im Sinne der Norm DIN-EN-ISO 7932:2005–03 validiert.

Die MALDI-TOF-MS-Methode muss auch bei der im Labor beabsichtigten Bandbreite der Bedingungen richtige Ergebnisse liefern. Hierfür wird die Robustheit für das Gesamtsystem abgeschätzt. Das Ergebnis der Betrachtung sollte in einem zusammenfassenden Statement dokumentiert werden. Zeigt die Abschätzung der Robustheit für bestimmte vorgesehene Bedingungen keine ausreichend sichere Identifizierung, werden für die Methode entsprechend klare Einschränkungen formuliert (Bsp.: „validiert nur für Kultivierung auf Schafblut-Agar unter aeroben Bedingungen“, „nach Ethanol-Ameisensäure-Extraktions-Protokoll“, „nicht für geräucherte Produkte“).

7 Interpretation der Identifizierungsergebnisse

Bei der Interpretation einer Zuordnung per MALDI-TOF-MS sind neben den technischen Entscheidungsregeln auch die den Parameter betreffenden Hersteller-Hinweise sowie die Ergebnisse der eigenen Validierung nach dieser Leitlinie zu berücksichtigen. Voraussetzung dafür sind die technisch einwandfreie Durchführung der Anzucht (bei Mikroorganismen), die Probenpräparation des reinen Isolates/Materials und die Messung am kalibrierten MALDI-TOF-MS-System.

Für die Validierung der nicht gerichteten Identifizierung (Screening) und der zielgerichteten Identifizierung konkreter Parameter wird keine Interpretation von Proben vorgenommen, für die keine Zuordnung gelang. Für diese nicht identifizierten Proben wird keine Aussage getroffen.

Wurde das MALDI-TOF-MS-Verfahren als Bestätigungsprüfung für konkrete Parameter validiert, sind positive wie negative Angaben der Zuordnung für diese Parameter möglich.

8 Erneuerung der Validierung bei veränderter Datenbank

Für zukünftige Versionen der agilen Referenzdatenbank ist ein Verfahren festzulegen, ob bzw. ab welchen Datenbankänderungen die für das Labor relevanten Parameter unmittelbar betroffen sein könnten.

Ist durch eine Datenbankänderung ein Einfluss auf die Identifizierungsentscheidung eines validierten Parameters zu vermuten, muss zur Überprüfung die formale Validierung für den betroffenen Parameter mit der neuen Version der Datenbank wiederholt werden. Dies gilt insbesondere bei Änderung der Identifizierungskriterien oder bei Änderung des identifizierenden Algorithmus. Je nach Anwendungszweck kann zusätzlich festgelegt werden, ab welchem Ausmaß der Datenbankänderung eine neue Validierung notwendig wird (beispielsweise bei Änderungen die mehr als 10 % der Referenzeinträge zur letzten Validierung umfassen).

Zur Überprüfung kann die zur ursprünglichen Validierung verwendete Einzelspektren-Sammlung erneut mit der neuen Version der Datenbank abgeglichen werden. Es ist dazu nicht zwangsläufig notwendig, neue Spektren aufzunehmen.

9 Ringversuch

Über einen Ringversuch, bei dem identische Proben im selben Zeitraum von mehreren Laboratorien untersucht werden, kann die Gebrauchstauglichkeit von MALDI-TOF-MS-Systemen abgeschätzt werden [Huber et al., 2017]. Der Erfolg der Identifizierung eines Ziel-Parameters mittels MALDI-TOF-MS

ist jedoch unmittelbar abhängig von mehreren *Vor-Ort*-Faktoren, die nicht vollständig mit einem klassischen Ringversuch einer Methodenvorschrift abgeprüft werden können [Huber et al., 2017].

Überprüft werden kann,

- ob die Probengewinnung und Probenvorbereitung laborübergreifend beherrscht wird (Schlüssigkeit der Methodenbeschreibung, von der Kultur bis zum Probenträger, Erfolg des Trainings der durchführenden Mitarbeiter, Darstellung der Toleranz des Verfahrens bezüglich üblicher Abweichungen),
- ob die MALDI-TOF-MS-Messungen an den Geräten der Teilnehmenden vergleichbare Einzelspektren ergeben und somit, ob die im Labor verwendete Geräteperformance und die Kalibration geeignet sind,
- ob die Interpretation des erhaltenen individuellen Identifizierungsergebnisses im Sinne dieser Leitlinien erfolgt. Da der individuelle Datenbankstand entscheidend für die Interpretation ist, muss dieser hierbei jeweils schlüssig berücksichtigt werden. Die Identifizierungsergebnisse der teilnehmenden Labore sind dabei nicht zwingend identisch. Hiermit kann jeweils die Gebrauchstauglichkeit im Labor belegt werden.

Ob die individuellen Referenzdatenbanken und Auswertemethoden den Ziel-Parameter erfassen, ist dagegen kein Kriterium der Methode an sich.

Ein Ringversuch kann verschiedene Probensets beinhalten.

1. Es werden Referenzisolate/-materialien verwendet, von denen erwartet wird, dass die untersuchte Spezies in den Datenbanken aller Teilnehmenden (Mitarbeitende im Sinne der ISO 16140-1) des Ringversuches grundsätzlich in ausreichender Zahl repräsentiert ist (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, ...).
2. In einem zweiten Satz werden Referenzisolate/-materialien verwendet, die im gleichen Umfeld vorkommen oder taxonomisch nah verwandt zu den Spezies unter Nr. 1. sind.
3. Es können ergänzend Referenzisolate/-materialien eingesetzt werden, von denen erwartet wird, dass die Spezies nicht in den üblichen Datenbanken enthalten ist.

Die Auswahl sollte wichtige Spezies, für die eine Abdeckung in den Datenbanken erwartet werden kann, umfassen. Für diese Ziel-Parameter sind spezifische Methodenbeschreibungen denkbar.

Ein Ringversuchskonzept ist in Anhang 5 wiedergegeben.

Referenzen

- DIN EN ISO 16140-1:2016-11: Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Verfahrensvalidierung – Teil 1: Terminologie (ISO 16140-1:2016); Deutsche Fassung EN ISO 16140-1:2016.
- DIN EN ISO 16140-2:2016-11: Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Verfahrensvalidierung – Teil 2: Arbeitsvorschrift für die Validierung von alternativen (urheberrechtlich geschützten) Verfahren anhand eines Referenzverfahrens (ISO 16140-2:2016); Deutsche Fassung EN ISO 16140-2:2016.
- ISO 16140-3:2021(en): Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory.
- DIN EN ISO 16140-4:2018-02: Entwurf. Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Verfahrensvalidierung – Teil 4: Arbeitsvorschrift für innerbetriebliche (Einzel-)Labor-Verfahrensvalidierung (ISO/DIS 16140-4:2017); Deutsche und englische Fassung prEN ISO 16140-4:2017.
- DIN EN ISO 16140-6:2020-04: Mikrobiologie der Lebensmittelkette – Verfahrensvalidierung – Teil 6: Arbeitsvorschrift für die Validierung von (urheberrechtlich geschützten) Alternativverfahren für die Bestätigungs- und Typisierungsprüfung (ISO 16140-6:2019); Deutsche Fassung EN ISO 16140-6:2019.
- DIN EN ISO 7932:2005-03: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zur Zählung von präsumtivem *Bacillus cereus* - Koloniezählverfahren bei 30 °C (ISO 7932:2004); Deutsche Fassung EN ISO 7932:2004.
- Dyk M, Wenninger O, Guckert C, Fuchs J, Wind C, Hiller E, Schreiter P, Rau J (2020) Collection of sample preparation protocols for MALDI-TOF MS-based identification of meat, dairy products, fish and insects. *Aspects of Food Control and Animal Health* 13: 1-13.
<https://ejournal.cvuas.de/issue202013.asp>
- Huber I, Pavlovic M, Maggipinto M, Konrad R, Busch U (2017) Interlaboratory proficiency test using MALDI-TOF MS for identification of food-associated bacteria. *Food Anal. Methods* 11: 1068-1075.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-017-1084-y>
- Patel R (2019) A moldy application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification. *J. Fungi* (Basel) 5: 4.
<https://doi.org/10.3390/jof5010004>
- Pavlovic M, Wudy C, Zeller-Peronnet V, Maggipinto M, Zimmermann P, Straubinger A, Iwobi A, Märtlbauer E, Busch U, Huber I (2015). Identification of bacteria isolated from veterinary clinical specimens using MALDI-TOF MS. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 128: 24– 30.
<https://doi.org/10.2376/0005-9366-128-24>
- Rahi P, Om P, Shouche SY (2016) Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based microbial identifications: challenges and scopes for microbial ecologists. *Front. Microbiol.* 7: 1359.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01359>
- Rau J, Eisenberg T, Sting R (2016a) MALDI-UP – an internet platform for the exchange of MALDI-TOF mass spectra. <https://maldi-up.ua-bw.de>. *Aspects of Food Control and Animal Health* 01 – 2016.
https://ejournal.cvuas.de/docs/cvuas_ejournal_201601.pdf
- Rau J, Männig A, Hiller E, Mauder N, Wind C, Horlacher S, Kadlec K, Schwarz S, Contzen M (2016b) MALDI-TOF mass spectrometry for reliable identification of bacteria – A validation based on *Staphylococcaceae* field isolates. *Aspects of Food Control and Animal Health* 03 – 2016.
https://ejournal.cvuas.de/docs/cvuas_ejournal_201603.pdf

- Rau J, Korte N, Dyk M, Wenninger O, Schreiter P, Hiller E (2020) Rapid animal species identification of feta and mozzarella cheese using MALDI-TOF mass-spectrometry. *Food Contr.* 117: 107349.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107349>
- Rau J, Hiller E, Männig A, Dyk M, Wenninger O, Stoll P, Wibbelt G, Schreiter P (2021) Animal species identification of meat using MALDI-TOF Mass-Spectrometry. *ChemRxiv. Preprint*.
<https://doi.org/10.26434/chemrxiv.14229413.v1>
- Rawel H, Huschek G, Homann T (2019). MaldI-TOF/MS. In: Angewandte instrumentelle Lebensmittel-analytik. Drusch, Kroh, Mattisek (Hrsg.). Behr's Verlag, Hamburg.
- Reich M, Bosshard PP, Stark M, Beyser K, Borgmann S (2013) Species identification of bacteria and fungi from solid and liquid culture media by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Bact. Parasit.* S5-002.
<https://doi.org/10.4172/2155-9597.S5-002>
- Rodríguez-Sánchez B, Cercenado E, Coste AT, Greub G (2019) Review of the impact of MALDI-TOF MS in public health and hospital hygiene, 2018. *Euro. Surveill.* 24: 1800193.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.4.1800193>
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS (2015) MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6: 791.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
- Stahl A, Schröder U (2017) Development of a MALDI-TOF MS-based protein fingerprint database of common food fish allowing fast and reliable identification of fraud and substitution. *J. Agric. Food Chem.* 2017, 65, 34, 7519-7527.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02826>
- Trevethan R (2017): Sensitivity, specificity, and predictive values: foundations, pliabilitys, and pitfalls in research and practice. *Front. Public Health.* 5: 307.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00307>
- Ulrich S, Gottschalk C, Dietrich R, Märtlbauer E, Gareis M (2019) Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS. *Food Microbiology* 82: 75-81.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.012>
- Verordnung (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. März 2017 über amtliche Kontrollen und andere amtliche Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel. *Amtsbl. Europ. Union*, L 95/1, 17.04.2017.
- Wieme AD, Spitaels F, Aerts M, De Bruyne K, Van Landschoot A, Vandamme P (2014) Effects of growth medium on matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectra: a case study of acetic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 1528-38.
<https://doi.org/10.1128/AEM.03708-13>

Anhang

Anhang 1: Einstufung der Validität von Vergleichsisolaten und Vergleichsmaterialien

Die Benennung der Isolate/Materialien sollte sich nach dem aktuell anerkannten Stand der Taxonomie richten. Die Isolate/Materialien werden vor der Verwendung hinsichtlich der Vertrauenswürdigkeit ihrer Benennung (Validität) eingestuft. Die Einstufung erfolgt nach Bewertung aller vorliegenden Informationen zum Isolat/Material. Die folgende Tabelle zeigt Beispiele [nach Rau et al., 2016b].

Es werden bei der Validität fünf Stufen unterschieden:

Validität	Mikroorganismen	Andere Materialien
0	Unbekanntes Isolat, ohne Vorinformation; zweifelhaftes Isolat/Probe	Unbekanntes Material, ohne Vorinformation; zweifelhaftes Material/ Probe
1	Isolat, für das standardisierte Basisinformationen vorliegen (<i>Salmonella</i> sp., präsumtiver <i>Bacillus cereus</i> nach § 64- Methodik, andere validierte Prüfmethode...)	Material, für welches Informationen lt. Kennzeichnung/Kennlichmachung vorliegen (z. B. Schweinelende)
2	Isolat, dessen Benennung durch zusätzliche Ergebnisse bestätigt wurde, die aber der Stufe 3 noch nicht entsprechen (z. B. „ <i>Bacillus subtilis</i> mit eindeutigem biochemischen Profil“). Die Einstufung des Genus gilt auf dieser Stufe als sicher.	Material, das durch eine grobsinnliche Untersuchung (Sensorik/Morphologie) in der Zuordnung bestätigt wurde (z. B. ganzes Huhn, Steinpilz)
3	Isolat, über das weitergehende genetische oder phänotypische Informationen vorliegen, welche die Benennung auf Speziesebene zweifelsfrei machen. Dies können z. B. sein: - zertifizierte oder gut Literatur-bekannte Referenzstämme aus öffentlichen Sammlungen (Referenzstämme); - Isolate mit Informationen über ihre 16S-rRNA oder <i>rpoB</i> Sequenzen. - Isolate, für die PCR-Untersuchungen vorliegen, die konkrete speziesspezifische Informationen liefern (<i>ail</i> -Gen bei <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>ces</i> -Gen bei <i>Bacillus cereus</i>)	Material, das von einem Experten, einer Expertin in der Spezies bestimmt wurde (z. B. der Tierpathologie, der Pilzsachkunde) oder Material mit Spezies-definierenden genetischen Informationen, z. B. Sequenzierung des Cytochrom-b-Gens Referenzmaterialien aus öffentlichen Sammlungen
4	In der Spezies sicher benanntes Isolat, für das über die Stufe 3 hinausgehende typisierende Informationen vorliegen (<i>Salmonella enterica</i> mit Serovar; Vollgenom liegt vor).	In der Spezies sicher benanntes Material, für das über die Stufe 3 hinausgehende Informationen vorliegen. Material mit bekannter Unterart (z. B. <i>Sus scrofa scrofa</i>)

Die für die jeweilige Einstufung notwendigen Daten werden vor jeder Validierung zusammengestellt und dokumentiert. Sofern es die Beschaffenheit zulässt, sollte das Validierungsmaterial so lange wie möglich konserviert werden (z. B. gefroren, in 70 %-igem Ethanol, gefriergetrocknet, o. Ä.).

Anhang 2: Empfohlene minimale Stichprobengrößen von Ziel-Parameter und Nicht-Ziel-Parameter zur Ermittlung von zu erreichenden Leistungskennzahlen für MALDI-TOF-MS-Anwendungen

Die Validierung der zielgerichteten Identifizierung konkreter Parameter und der Bestätigungsprüfung bedingen aufgrund der zu erreichenden minimalen Richtig-positiv-Rate (*RPR*) und der minimalen Richtig-negativ-Rate (*RNR*) eine Mindestanzahl an Proben für die Vergleichsuntersuchung. Bei der Identifizierung mit MALDI-TOF-MS hat die Falsch-positiv-Rate ein besonderes Gewicht bei der Interpretierbarkeit der Ergebnisse. Es wird die Erwartung mit den Ergebnissen der zu validierenden Methode verglichen.

	Nicht gerichtete Identifizierung (Screening)	zielgerichtete Identifizierung konkreter Parameter	Bestätigungsprüfung konkreter Parameter
Spektren ohne Identifizierungsergebnis	werden nicht ausgewertet	werden nicht ausgewertet	werden ausgewertet
Anteil an Spektren mit Identifizierungsergebnis	wird zur Information angegeben	wird zur Information angegeben	100 %
minimale Gesamtzahl unabhängiger Spektren davon 20% eigene Spektren	$\geq 500^*$ $\geq 0,2 \times n$	nicht anwendbar	nicht anwendbar
Untersuchung auf Inklusivität Anzahl an unabhängigen, gewerteten Spektren des Ziel-Parameters (<i>n</i>) davon eigene Spektren (20 % von <i>n</i>)	nicht anwendbar	$\geq 20^*$ $\geq 0,2 \times n$	$\geq 50^{**}$ $\geq 0,2 \times n$
Richtig-positiv-Rate (<i>RPR</i>)		$\geq 95,0 \%$	$\geq 98,0 \%$
Falsch-negativ-Rate (<i>FNR</i>)		$\leq 1,0 \%$	$\leq 1,0 \%$
Exklusivität Anzahl an unabhängigen Spektren der Nicht-Ziel-Parameter (<i>m</i>) davon eigene Spektren (20 % von <i>m</i>)	nicht anwendbar	$\geq 30^*$ $\geq 0,2 \times m$	$\geq 30^{**}$ $\geq 0,2 \times m$
Richtig-negativ-Rate (<i>RNR</i>)		$\geq 99,0 \%$	$\geq 99,0 \%$
Falsch-positiv-Rate (<i>FPR</i>)		$\leq 1,0 \%$	$\leq 1,0 \%$
Korrektklassifikationsrate (<i>KKR</i>)	$\geq 95,0 \%$		

* Bei einigen Mikroorganismen/Materialien sowie einigen speziell definierten Anwendungszwecken („beispielsweise einer Anwendung mit kleiner Speziesvariation und somit geringem Umfang“) ist es schwierig, die geforderte Anzahl für eine Stichprobe zur Untersuchung auf Inklusivität und Exklusivität zu erhalten. In diesen Fällen kann die Mindeststichprobengröße für die Validierung der nicht gerichteten Identifizierung auch einen angepassten geringeren Umfang aufweisen. Eine Orientierung bieten hier die unter der zielgerichteten Identifizierung konkreter Parameter (6.2) beschriebenen Stichprobengrößen.

** Die Stichprobe für die Bestätigungsprüfung ist in Übereinstimmung mit Kap. 5.1.5 „Untersuchung zur Inklusivität und Exklusivität“ der DIN-EN-ISO 16140-2.

Anhang 3: Beispiele für Auswertungen von Validierungen

A3.1: Nicht gerichtete Identifizierung (Screening)

Beispiel A3.1.1: Identifizierung von Muskelfleisch auf Speziesebene

Parameter	Spezies
Anwendung	Muskelfleisch von Tieren
Umfeld	Lebensmittel, Muskelfleisch im Gewebsverband, roh oder thermisch behandelt
Metadaten / Herkunft	Dokumentation für alle verwendeten Materialien in MALDI-UP
Bedingungen vor der MALDI-Analyse	Reinmaterial, frisch oder tiefgefroren bei z. B. -20 °C
Probenpräparation	OS-Extraktion [Dyk et al., 2020]
MALDI-System	BRUKER LT-Microflex, Biotyper Standardeinstellungen (2-20 kDa [m/z])
Datenbank	Die zur Validierung verwendete Datenbank: UA-BW 420 Meat
System	BIOTYPER Version 3.1, Auswertung nach Vorgaben des Herstellers
Entscheidungsregel	Erster Hit score > 2,0; wenn zweiter Hit > 2,0, dann nicht im Widerspruch zu erstem Hit.

	Spektren	Vorgaben nach Anhang 2	Kriterium erfüllt
Zahl aller Spektren	1088	keine	
Davon Spektren mit Identifizierungsergebnis	863	≥ 500	Ja
davon 20% eigene Spektren	863	> 173	Ja
Identifiziert-Rate (IDR)	79,3 %	keine	
MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der Übereinstimmungen in Bezug auf die Erwartung (PA + NA)	861		
Anzahl der Abweichungen (PD + PA)	2		
Korrektklassifikationsrate (KKR)	99,7 %	≥ 95 %	Ja

Die Methode kann zur nicht gerichteten Identifizierung (Screening) von Muskelfleischproben eingesetzt werden.

Beispieldaten entnommen aus Rau et al., 2021

Beispiel A3.1.2: Identifizierung von Veterinärisolaten

Parameter	Spezies
Anwendung	Veterinärisolate
Umfeld	
Metadaten / Herkunft	
Bedingungen vor der MALDI-Analyse	
Probenpräparation	
MALDI-System	BRUKER LT-Microflex, Biotyper Standardeinstellungen (2-20 kDa [m/z])
Datenbank	Die zur Validierung verwendete Datenbank:
	BIOTYPER Version 3.1, Auswertung nach Vorgaben des Herstellers
Entscheidungsregel	Erster Hit score > 2,0; wenn zweiter Hit > 2,0, dann nicht im Widerspruch zu erstem Hit.

	Spektren	Vorgaben nach Anhang 2	Kriterium erfüllt
Zahl aller Spektren	375	keine	
Davon Spektren mit Identifizierungsergebnis	362	≥ 100*	Ja
davon 20% eigene Spektren	362	> 75	Ja
Identifiziert-Rate (IDR)	96,5 %	keine	
MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der Übereinstimmungen in Bezug auf die Erwartung (PA + NA)	359		
Anzahl der Abweichungen (PD + PA)	3		
Korrektklassifikationsrate (KKR)	99,2 %	≥ 95 %	Ja

* Für den hier definierten Anwendungszweck wird die Mindeststichprobengröße für die Validierung der nicht gerichteten Identifizierung angepasst.

Die Methode kann zur nicht gerichteten Identifizierung (Screening) von Isolaten der veterinärmedizinischen Diagnostik eingesetzt werden.

Beispieldaten entnommen aus Pavlovic et al., 2015

A3.2.: Zielgerichtete Identifizierung konkreter Parameter

Beispiel A3.2.1: Identifizierung von *Staphylococcus aureus*

Parameter	<i>Staphylococcus aureus</i>
Anwendung	Bakterienisolate aus Lebensmitteln und Proben der veterinärmedizinischen Diagnostik
Umfeld	Lebensmittel-Mikrobiologie, Mastitis, Veterinärmedizinische Diagnostik
Nicht-Ziel Parameter zur Ermittlung Falsch-positiv-Rate	Bakterienisolate der <i>Staphylococcaceae</i> und Isolate, die in anderen Methoden bereits als falsch-positiv identifiziert worden sind: Hier keine.
Metadaten / Herkunft	Dokumentation für alle verwendeten Isolate in MALDI-UP
Bedingungen vor der MALDI-Analyse	Reinkultur auf Schafblutagar oder anderem festem Nährmedium, aerob/mikroaerob inkubiert für 24 – 48 h bei 37 °C
Probenpräparation	DT, eDT, EFX
MALDI-System	BRUKER LT-Microflex, Biotyper Standardeinstellungen (2-20 kDa [m/z])
Datenbank	Die zur Validierung verwendete Datenbank : BRU 4096 + UA-BW 301
System	BIOTYPER Version 3.1, Auswertung nach Vorgaben des Herstellers
Entscheidungsregel	Erster Hit score > 2,0; wenn zweiter Hit > 2,0, dann nicht im Widerspruch zu erstem Hit. Ggf. Berücksichtigung von Hersteller-Hinweisen bei der Interpretation

	Ziel Parameter erwartetes Ergebnis	Spektren		Vorgaben nach Anhang 2	Kriterium erfüllt
	<i>Staphylococcus aureus</i> Zahl aller Spektren	51			
Untersuchungen auf Inklusivität	Davon Spektren des Parameters mit Identifizierungsergebnis (<i>n</i>)	51	Identifiziert-Rate (<i>IDR</i>) = 100 %	$n \geq 20$	Ja
	davon Eigenspektren	51		$\geq (0,2 \times n)$	Ja
	MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der positiven Übereinstimmungen (<i>PA</i>)	51	Richtig-positiv-Rate (<i>RPR</i>) = 100 %	$\geq 95 \%$	Ja
	Anzahl der negativen Abweichungen (<i>ND</i>)	0	Falsch-negativ-Rate (<i>FNR</i>) = 0 %	$\leq 1 \%$	Ja
	Nicht-Ziel Parameter erwartetes Ergebnis: <i>Keine Übereinstimmung mit dem Parameter</i> Zahl aller Spektren	171			
Untersuchungen auf Exklusivität	Davon mit Identifizierungsergebnis im Sinne der für den Parameter festgelegten Regel (<i>m</i>)	159	<i>IDR</i> = 93 %	$m \geq 30$	Ja
	davon Eigenspektren	159		$\geq (0,2 \times m)$	Ja
	MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der negativen Übereinstimmungen (<i>NA</i>)	159	Richtig-negativ-Rate (<i>RNR</i>) = 100 %	$\geq 99,0 \%$	Ja
	MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der positiven Abweichungen (<i>PD</i>)	0	Falsch-positiv-Rate (<i>FPR</i>) = 0 %	$\leq 1,0 \%$	Ja

Der o.g. Parameter kann mit der hiermit überprüften Methode zielgerichtet identifiziert werden.
Beispieldaten entnommen aus Rau et al., 2016b

Beispiel A3.2.2: Identifizierung von Muskelfleisch von Pferden

Parameter	<i>Equus</i> (Genus)
Anwendung	Muskelfleisch von Pferdeartigen (Genus <i>Equus</i>)
Umfeld	Lebensmittel, Muskelfleisch im Gewebsverband, roh oder thermisch behandelt
Nicht-Ziel Parameter zur Ermittlung Falsch-positiv-Rate	Muskelfleisch anderer Tiere, Mammalia, Reptilia, Aves
Metadaten / Herkunft	Dokumentation für alle verwendeten Materialien in MALDI-UP
Bedingungen vor der MALDI-Analyse	Reinmaterial, frisch oder tiefgefroren bei z. B. -20 °C
Probenpräparation	OS-Extraktion [Dyk et al., 2020]
MALDI-System	BRUKER LT-Microflex, Biotyper Standardeinstellungen (2-20 kDa [m/z])
Datenbank	Die zur Validierung verwendete Datenbank: UA-BW 420 Meat
System	BIOTYPER Version 3.1, Auswertung nach Vorgaben des Herstellers
Entscheidungsregel	Erster Hit score > 2,0; wenn zweiter Hit > 2,0, dann nicht im Widerspruch zu erstem Hit. Es wird auf Genus <i>Equus</i> ausgewertet.

Liste der im Genus erfassten Spezies	Anzahl	MALDI Ergebnis = <i>Equus</i>
<i>Equus caballus</i>	20	20
<i>Equus asinus</i>	4	4
<i>Equus grevy</i>	2	2
<i>Equus przewalskii</i>	1	1
<i>Equus quagga</i>	3	3
<i>Equus kiang</i>	1	1
<i>Equus hartmannae</i>	1	1
<i>Equus hemionus</i>	3	3
<i>Equus</i>	35	35

	Ziel Parameter erwartetes Ergebnis	Spektren	Vorgaben nach Anhang 2	Kriterium erfüllt
	<i>Equus (Genus)</i> Zahl aller Spektren	35		
Untersuchungen auf Inklusivität	Davon Spektren des Parameters mit Identifizierungsergebnis (<i>n</i>)	35 Identifiziert Rate (<i>IDR</i>) = 100 %	$n \geq 20$	Ja
	davon Eigenspektren	35	$\geq (0,2 \times n)$	Ja
	MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der positiven Übereinstimmungen (<i>PA</i>)	35 Richtig-positiv- Rate (<i>RPR</i>) = 100 %	$\geq 95,0 \%$	Ja
	Anzahl der negativen Abweichungen (<i>ND</i>)	0 Falsch- negativ- Rate (<i>FNR</i>) = 0 %	$\leq 1,0 \%$	Ja
	Nicht-Ziel Parameter erwartetes Ergebnis: <i>Keine Übereinstimmung mit dem Parameter</i>	1053		
Untersuchungen auf Exklusivität	Davon mit Identifizierungsergebnis im Sinne der für den Parameter festgelegten Regel (<i>m</i>)	1010 <i>IDR</i> = 95,9 %	≥ 30	Ja
	davon Eigenspektren	1010	$\geq (0,2 \times m)$	Ja
	MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der negativen Übereinstimmungen (<i>NA</i>)	1010 Richtig- negativ-Rate (<i>RNR</i>) = 100 %	$\geq 99,0 \%$	Ja
	MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der positiven Abweichungen (<i>PD</i>)	0 Falsch-positiv- Rate (<i>FPR</i>) = 0 %	$\leq 1,0 \%$	Ja

Der o.g. Parameter kann mit der hiermit überprüften Methode zielgerichtet identifiziert werden.
Beispieldaten entnommen aus Rau et al., 2021

Beispiel A3.2.3: Identifizierung von Fisch-Muskelfleisch

Parameter	<i>Gadus</i> (Genus)
Anwendung	Identifikation / Muskelfleisch von Vertretern der Gattung <i>Gadus</i> sp.
Umfeld	Lebensmittel, Muskelfleisch im Gewebsverband, ausschließlich roh und unbehandelt
Nicht-Ziel Parameter zur Ermittlung Falsch-positiv-Rate	Muskelfleisch weiterer, bevorzugt zum Verzehr genutzter Knochenfische (Osteichthyes). Im besonderen Fokus befinden sich aufgrund möglicher Verwechslung nahverwandte Fischarten innerhalb der Familie <i>Gadidae</i> (z. B. <i>Merlangius merlangus</i> , <i>Molva molva</i> [...])
Metadaten / Herkunft	In-house-Dokumentation
Bedingungen vor der MALDI-Analyse	Reines Muskelfleisch eines Individuums (keine ‚Blends‘), frisch (ohne Unterbrechung der Kühlkette) oder tiefgefroren
Probenpräparation	In-house-Methode, TFA-Extraktion mit definierter Verdünnungsstufe
MALDI-System	BRUKER LT-Microflex, Biotyper Standardeinstellungen (2-20 kDa [m/z])
Datenbank	MALDI-Fish_Version 1_170317
System	BIOTYPER Version 3.1, Auswertung nach Vorgaben des Herstellers
Entscheidungsregel	Erster Hit score > 2,00, Differenz zum Top Hit 1 außerhalb der <i>Gadus</i> -Gruppe mind. Δ 0,15 (ggf. Absicherung durch vorher definierte Marker-massen)

Liste der im Genus erfassten Spezies	Anzahl	MALDI Ergebnis = <i>Gadus</i>
<i>Gadus chalcogrammus</i>	21	21
<i>Gadus macrocephalus</i>	16	16
<i>Gadus morhua</i>	9	9
<i>Gadus</i>	46	46

	Ziel Parameter erwartetes Ergebnis	Spektren	Vorgaben nach Anhang 2	Kriterium erfüllt
	<i>Gadus (Genus)</i> Zahl aller Spektren	46		
Untersuchungen auf Inklusivität	Davon Spektren des Parameters mit Identifizierungsergebnis (<i>n</i>)	46	Identifiziert Rate (<i>IDR</i>) = 100 %	$n \geq 20$ Ja
	davon Eigenspektren	46		$\geq (0,2 \times n)$ Ja
	MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der positiven Übereinstimmungen (<i>PA</i>)	46	Richtig-positiv-Rate (<i>RPR</i>) = 100 %	$\geq 95,0 \%$ Ja
	Anzahl der negativen Abweichungen (<i>ND</i>)	0	Falsch-negativ-Rate (<i>FNR</i>) = 0 %	$\leq 1,0 \%$ Ja
	Nicht-Ziel Parameter erwartetes Ergebnis: <i>Keine Übereinstimmung mit dem Parameter</i>	172		
Untersuchungen auf Exklusivität	Davon mit Identifizierungsergebnis im Sinne der für den Parameter festgelegten Regel (<i>m</i>)	172*	<i>IDR</i> = 100 %	$m \geq 30$ Ja
	davon Eigenspektren	172		$\geq (0,2 \times m)$ Ja
	MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der negativen Übereinstimmungen (<i>NA</i>)	42	Richtig-negativ-Rate (<i>RNR</i>) = 100 %	$\geq 99,0 \%$ Ja
	MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der positiven Abweichungen (<i>PD</i>)	0	Falsch-positiv-Rate (<i>FPR</i>) = 0 %	$\leq 1 \%$ Ja

* 4/172 (2.3 %) Proben liefern einen Hit score >2.00 (*Melanogrammus aeglefinus* & *Merlangius merlangus*), Begutachtung artspezifischer Markermassen liefern eine eindeutige Differenzierung zu *Gadus* ssp.

Der o.g. Parameter kann mit der hiermit überprüften Methode zielgerichtet identifiziert werden.
Beispieldaten basierend auf Stahl & Schröder, 2017 sowie nachgezogenen Datenbankerweiterungen

A3.3: Bestätigungsprüfung konkreter Parameter

Beispiel A3.3.1: Muskelfleisch: Bestätigung des Parameters Aves (Vögel)

Parameter	Muskelfleisch von Aves (Vögel)
Anwendung	Lebensmittel, Muskelfleisch im Gewebsverband, roh oder thermisch behandelt
Nicht-Ziel Parameter zur Ermittlung der Falsch-positiv-Rate	Muskelfleisch anderer Tiere: Mammalia, Reptilia
Metadaten / Herkunft	Dokumentation für alle verwendeten Materialien in MALDI-UP
Bedingungen vor der MALDI-Analyse	Reinmaterial, frisch oder tiefgefroren bei z. B. -20 °C
Probenpräparation	OS-Extraktion [Dyk et al., 2020]
MALDI-System	BRUKER LT-Microflex, Biotyper Standardeinstellungen (2-20 kDa [m/z])
Datenbank	Die zur Validierung verwendete Datenbank: UA-BW 420 Meat
System	BIOTYPER Version 3.1, Auswertung nach Vorgaben des Herstellers
Entscheidungsregel	Erster Hit score > 2,0; wenn zweiter Hit > 2,0, dann nicht im Widerspruch zu erstem Hit. Es wird auf Ebene der Ordnung Aves ausgewertet.

	Ziel Parameter erwartetes Ergebnis:	Spektren	Vorgaben nach Anhang 2	Kriterium erfüllt	
Untersuchungen auf Inklusivität	Aves = Vögel Zahl aller Spektren (<i>n</i>)	369	$n \geq 50$	Ja	
	davon Eigenspektren	369	$\geq (0,2 \times n)$	Ja	
	MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der positiven Übereinstimmungen (<i>PA</i>)	369	Richtig-positiv-Rate (<i>RPR</i>) = 100 %	$\geq 98,0 \%$	Ja
	Anzahl der negativen Abweichungen (<i>ND</i>)	0	Falsch-negativ-Rate (<i>FNR</i>) = 0 %	$\leq 1 \%$	Ja
Untersuchungen auf Exklusivität	Nicht-Ziel Parameter erwartetes Ergebnis: <i>Keine Übereinstimmung mit dem Parameter /</i> Zahl aller Spektren (<i>m</i>)	719	$m \geq 30$	Ja	
	davon Eigenspektren	719	$\geq (0,2 \times m)$	Ja	
	MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der negativen Übereinstimmungen (<i>NA</i>)	719	Richtig-negativ-Rate (<i>RNR</i>) = 100 %	$\geq 99 \%$	Ja
	MALDI-TOF-MS-Ergebnis: Anzahl der positiven Abweichungen (<i>PD</i>)	0	Falsch-positiv-Rate (<i>FPR</i>) = 0 %	$\leq 1 \%$	Ja

Der o.g. Parameter kann mit der hiermit überprüften Methode bestätigt werden.

Beispieldaten entnommen aus Rau et al., 2021

Anhang 4: Beispiele für einen Test auf Robustheit

Bei der Speziesidentifizierung von **tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln, Lebensmitteln aus Pilzen oder Futtermitteln** sind für die jeweilige Produktgruppe diejenigen typischen und technologischen Verfahren zu berücksichtigen, die bei dem zu untersuchenden Probenspektrum des Labors erwartet werden. Diese können z. B. Einfrieren, Erhitzungsverfahren oder andere Zubereitungsmethoden umfassen. Es sind für jeden zu überprüfenden Faktor jeweils mindestens drei unabhängige Proben der Produktgruppe zu untersuchen [Bsp. Rau et al., 2020, Rau et al., 2021].

Beispiel: Identifizierung von Muskelfleisch nach Einfrieren / Erhitzung

Parameter	<i>Schwein, Rind, Huhn, Pute</i>
Anwendung	Lebensmittel, Muskelfleisch im Gewebsverband
Bedingungen vor dem Test	Reinmaterial, frisch
einfrieren	-20 °C Langzeittest
thermisch behandelt	Kochen 100 °C / 15 Min
thermisch behandelt	Braten in der Pfanne 200 °C / 6 Min (3 Min pro Seite), 1 cm Scheiben
Probenpräparation	OS-Extraktion
MALDI-System	BRUKER LT-Microflex, Biotyper Standardeinstellungen (2-20 kDa [m/z])
Datenbank	UA-BW 420 Meat
System	BIOTYPER Version 3.1, Auswertung nach Vorgaben des Herstellers
Entscheidungsregel	Erster Hit score >2,0; wenn zweiter Hit >2,0, dann nicht im Widerspruch zu erstem Hit. Es wird auf Spezies Ebene ausgewertet.

Zubereitung	Ort der Probenname	Tierart der Muskelfleischprobe				Bewertung
		Schwein (n = 3)	Rind (n = 3)	Huhn (n = 3)	Pute (n = 3)	
roh	Oberfläche	<i>Sus (S.) scrofa</i>	<i>Bos (B.) taurus</i>	<i>Gallus (G.) gallus</i>	<i>Meleagris (M.) gallopavo</i>	Kontrolle
Einfrieren -20 °C 54 Monate	Innen	<i>S. scrofa</i>	<i>B. taurus</i>	<i>G. gallus</i>	<i>M. gallopavo</i>	geeignet
Gekocht 100 °C 15 Minuten	Innen	<i>S. scrofa</i>	<i>B. taurus</i>	<i>G. gallus</i>	<i>M. gallopavo</i>	geeignet
	Oberfläche	<i>S. scrofa</i>	<i>B. taurus</i>	<i>G. gallus</i>	<i>M. gallopavo</i>	geeignet
Gebraten 250 °C 6 Minuten	Innen	<i>S. scrofa</i>	<i>B. taurus</i>	<i>G. gallus</i>	<i>M. gallopavo</i>	geeignet
	Oberfläche	not identified	<i>B. taurus</i>	not identified	<i>M. gallopavo</i>	nur eingeschränkt geeignet

Das Verfahren zur Identifizierung von Muskelfleisch ist auch nach Lagerung bei -20 °C (Einfrieren) bis zu 54 Monaten geeignet. Das Verfahren zur Identifizierung von Muskelfleisch ist auch nach Kochen und Braten des Fleisches geeignet. Hierbei ist das Innere der Probe zu verwenden.

Beispieldaten aus Rau et al., 2021

Anhang 5: Ablauf einer Validierungsuntersuchung mittels Parallelblindproben

[vgl. Huber et al., 2017]

