

Zeitschrift: Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchungen und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 92 (2001)
Heft: 1

Artikel: Bericht zum Workshop "Methodenvalidierung in der Mikrobiologie: Klassische und molekularbiologische Prüfverfahren" vom 1. November 2000 am AC-Laboratorium Spiez : gemeinsame Veranstaltung der SGLH und IGHAM
Autor: Hübner, Ph.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-981902>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 14.03.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Bericht zum Workshop «Methodenvalidierung in der Mikrobiologie: Klassische und molekularbiologische Prüfverfahren» vom 1. November 2000 am AC-Laboratorium Spiez

Gemeinsame Veranstaltung der SGLH und IGHAM

Mehr als 80 Teilnehmer nahmen an diesem Workshop teil. Am Vormittag wurde die Thematik von vier Referenten eingeführt.

J.-L. Cordier stellte anhand der ISO-Norm 16140, welche voraussichtlich im Jahr 2001 publiziert wird, das Validierungsverfahren für alternative Methoden vor. In der ersten Phase wird die alternative Methode in einem Expertenlaboratorium mit der bestehenden «Norm-Methode» verglichen. Dabei werden nach den Vorgaben der ISO-Norm 16140 die verschiedenen Validierungsparameter bestimmt. Der Zeitaufwand dafür wurde von J.-L. Cordier mit 9–12 Monaten angegeben. In der zweiten Phase des Validierungsverfahrens wird die alternative Methode in einem Interlaborvergleich ausgetestet. Dabei müssen die teilnehmenden Laboratorien wie auch die zu testende Alternativmethode gewisse in der ISO-Norm 16140 vorgegebene Anforderungen erfüllen. J.-L. Cordier ging zum Schluss seines Referates kurz auf die verschiedenen Validierungspunkte für quantitative und qualitative mikrobiologische Prüfverfahren ein.

J. Rentsch stellte im zweiten Referat die Validierung einer alternativen Nachweismethode für *Listeria monocytogenes* vor, welche auf Real-time-PCR basiert. Nach einer Voranreicherung wird die DNA aus den Bakterien isoliert und ein Fragment des *iap*-Gens (invasion associated protein) mittels Real-time-PCR amplifiziert. Die Zielsequenz kann aufgrund von weniger stark konservierten DNA-Abschnitten innerhalb des amplifizierten Fragmentes ebenfalls zur Typisierung der *Listeria*-Isolate verwendet werden. Obwohl mit isolierter bakterieller DNA der Nachweis von wenigen Genomäquivalenten möglich ist, liegt die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens trotz Voranreicherung höher als diejenige der Normmethode. Erst bei einer künstlichen Kontamination von mehr als 12 cfu/g Lebensmittel war der Nachweis mit der Alternativmethode positiv. Als Hauptproblem der alternativen Prüfmethode für Listerien stellte sich die geringe Effizienz der DNA-

Extraktion heraus. Die Nachweisgrenze für angereicherte Listerien lag aufgrund dieser Schwierigkeit nur bei ca. 10^4 Bakterien. J. Rentsch stellte am Schluss seines Referates Lösungsansätze für die Verbesserung des DNA-Extraktionsverfahrens für Listerien vor.

Thomas Jemmi und Ch. Griot hielten zusammen das dritte Referat. Th. Jemmi betonte, dass das Validierungsverfahren dem Labor und den zu untersuchenden Parametern angepasst werden müsse, was eine «denkende Diagnostik» (know how) voraussetze. Innerhalb von 9 Monaten wurden zwei Nachweismethoden für *Listeria monocytogenes* anhand von über 1800 Proben verglichen und die Validierungsparameter Sensitivität, Selektivität und Falsch-Positiv-Rate bestimmt. Da natürlich kontaminierte Proben verwendet wurden, erwies es sich als inpraktikabel, aufgrund der inhomogenen Verteilung der Keime in der Probe verlässliche Aussagen zur Spezifität zu machen. Als zweites Beispiel stellte Th. Jemmi die Revalidierung eines Nachweisverfahrens für ZNS-Gewebe aus Rindern vor. Der verwendete monoklonale Antikörper ist gegen die neuronale Enolase aus Rindern gerichtet, reagiert aber kreuz mit anderen Rinderproteinen, so dass eine sinnvolle Aussage nur mit Westernblotting möglich ist. Anhand von speziellen Referenzwürsten mit Kalbshirnanteilen zwischen 0 % und 1 % wurde eine Nachweisgrenze von 0,1 % Kalbshirnanteil ermittelt. Die Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit wurde in einem Laborvergleich mit zwei Laboratorien untersucht. Die Methode wurde zur Untersuchung von 100 Feldproben eingesetzt. Bei zwei positiven Proben wurde nachweislich Kalbshirn verwendet. Ch. Griot vertrat den Grundsatz, dass die Validierung ein vertretbarer Aufwand darstellen müsse und bezifferte den finanziellen Aufwand zur Entwicklung und Validierung einer auf Real-time-PCR basierenden Prüfmethode mit 140000 bis 180000 sfr. Real-time-PCR-Verfahren eignen sich wegen der möglichen Automatisierung für hohe Probendurchsätze und können auch für qualitative Aussagen eingesetzt werden. Zum Schluss seines Referates ging Ch. Griot kurz auf die neue Akkreditierungsnorm ISO 17025 ein. Die Probenahme müsse künftig besser definiert und dokumentiert werden, Prüfberichte mit Interpretationen versehen und allfällige Kundenwünsche (künftig) vermehrt berücksichtigt werden.

Am Nachmittag wurden nach einer kurzen Einleitung verschiedene Aspekte der Validierung von In-house-Methoden in drei Diskussionsgruppen erörtert. Zu diesem Zweck wurde den Workshop-Teilnehmenden ein von den Kantonalen Laboratorien Basel-Stadt und Zürich erarbeitetes Diskussionspapier zugestellt. Die Diskussionen wurden von drei Rapporteurs (S. Gautsch und R. Ewald, beide KL BS; Ph. Hübner KL ZH) zusammengefasst und dem Plenum kurz vorgestellt. Überraschend war die signalisierte Bereitschaft, selbst bei einer In-house-Validierung die Vorgaben der ISO-Norm 16140 heranzuziehen, obwohl dies im Vorwort der ISO-Norm explizit als möglicherweise ungeeignetes, weil zu aufwendiges Vorgehen beurteilt wird. Weiter fiel die Schwierigkeit auf, bei quantitativen Prüfverfahren die Bestimmungsgrenze experimentell zu bestimmen, so dass oft der unterste Kalibrationspunkt als Bestimmungsgrenze angegeben wird. In der ISO-

Norm 16140 fehlen diesbezüglich bis anhin spezifische Angaben, welche Bedingungen für die Bestimmungsgrenzen genau gelten (z.B. $CV (\%) < xy (\%)$). Die Anzahl der zu untersuchenden Matrices bei einer horizontalen Methode soll gemäss den Erfahrungen des Laboratoriums und der Epidemiologie des Erregers bestimmt werden, wobei sich ein Konsens für mindestens vier Matrices fand. Ein interessanter Validierungsansatz wurde aus dem Text der (revidierten) Hygieneverordnung abgeleitet, welche alternative Prüfverfahren ausdrücklich zulässt, wenn diese zu gleichen lebensmittelrechtlichen Beurteilungen führen. Das Auftragen der Beurteilungen mit der Norm- und der Alternativmethode bezüglich Toleranzwert respektive Grenzwert in einem Vierfeldertest erwies sich dabei als eine mit vertretbarem Aufwand durchzuführende Validierungsalternative für quantitative Methoden. Somit entfällt die experimentell aufwendige Arbeit zum Festlegen der Bestimmungsgrenze (s.o.) sowie des linearen Bereiches.

Dass trotz der grossen Teilnehmerzahl angeregte Diskussionen in einer kollegialen und offenen Atmosphäre stattfanden, wurde von vielen Teilnehmern geschätzt und gelobt. In Anbetracht der komplexen Materie, der grossen Teilnehmerzahl und der relativ kurz bemessenen Diskussionszeit konnte kein abschliessender Konsens über das Vorgehen bei der Validierung von In-house-Methoden erarbeitet werden. Hingegen soll das erarbeitete und verteilte Diskussionspapier in geeigneter Form publiziert werden.

Die Veranstaltung endete um 16.30 Uhr.

Ph. Hübner, KL ZH und SGLH Vostand, Zürich