

1. Mikrobiologische Untersuchungsvorschriften zur Lebensmitteluntersuchung

Dieses Regelungsbeispiel aus einem realen Laboratorium gibt einen sehr umfassenden Überblick über die möglichen Validierungsschritte. Selbstverständlich ist dieses Beispiel nicht als starre Vorgabe zu betrachten, nach der in jedem Fall zu verfahren ist. Gerade in der Mikrobiologie sind die erforderlichen Validierungsschritte an der jeweiligen Aufgabenstellung zu orientieren. Die durchzuführenden Validierungsschritte liegen in der Verantwortung des Prüfleiters.

1.1 Methodenauswahl/-beschreibung

- a) Amtliche Methoden
- b) Modifizierte amtliche Methoden
- c) Literaturmethoden

1.2 Schulung der Mitarbeiter

Prüfung der zur Durchführung der Methode erforderlichen Prüfmittel

Geräte (gemäß Geräteanweisungen):
z.B. temperaturgeregelte Geräte

Material (gemäß Prüfanweisungen):
z.B. Nährmedien, Reagenzien

1.3 Umfang der durchzuführenden Validierungsmaßnahmen

a) Amtliche Methoden:

- ◆ Spezifität/Selektivität (Prüfung mit Referenzstämmen)
- ◆ Nachweisgrenze (Prüfung mit definierten Keimgehalten)
- ◆ Wiederfindung (Prüfung mit definierten Keimgehalten, Prüfung von Lebensmittelproben mit definierten Keimzahlen)
- ◆ Richtigkeit (Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen)
- ◆ Präzision (z. B. max. zulässige Abweichung Faktor 10 bei Keimzahlbestimmungen)

b) Modifizierte amtliche Methoden:

- ◆ Spezifität/Selektivität (Prüfung mit Referenzstämmen)
- ◆ Nachweisgrenze (Prüfung mit definierten Keimgehalten)
- ◆ Wiederfindung (Prüfung mit definierten Keimgehalten, Prüfung von Lebensmittelproben mit definierten Keimgehalten)
- ◆ Richtigkeit (Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen)
- ◆ Präzision (z.B. max. zulässige Abweichung Faktor 10 bei Keimzahlbestimmungen)
- ◆ Plausibilität (z.B. Vergleich mit anderen Verfahren)

c) Literaturmethoden:

- ◆ Spezifität/ Selektivität (Prüfung mit Referenzstämmen)
- ◆ Nachweisgrenze (Prüfung mit definierten Keimgehalten)
- ◆ Wiederfindung (Prüfung mit definierten Keimgehalten, Prüfung von Lebensmittelproben mit definierten Keimzahlen)
- ◆ Richtigkeit (Teilnahme an Eignungsprüfungen/Vergleichsuntersuchungen)
- ◆ Präzision (z.B. max. zulässige Abweichung Faktor 10 bei Keimzahlbestimmungen)
- ◆ Plausibilität (z.B. Vergleich mit anderen Verfahren, z.B. amtliche Verfahren)

1.4 Erstellung und Freigabe einer Prüfanweisung

Die einzelnen Validierungsmaßnahmen werden dokumentiert und beim Prüfleiter verfügbar gehalten. Der Prüfleiter stellt aufgrund der ihm vorliegenden Ergebnisse fest, ob die gewählte Methode für die beabsichtigte Verwendung geeignet ist. Der Prüfleiter gibt die Prüfmethode in Form einer Prüfanweisung für das Labor frei.

2. Chemische Untersuchungsvorschriften (allgemeine lebensmittelchemische Untersuchungen)

Dieses Regelungsbeispiel aus einem realen Laboratorium gibt einen sehr umfassenden Überblick über die möglichen Validierungsschritte. Selbstverständlich ist auch dieses Beispiel nicht als starre Vorgabe zu betrachten, nach der in jedem Fall zu verfahren ist. Die erforderlichen Validierungsschritte sind an der jeweiligen Aufgabenstellung zu orientieren. Die durchzuführenden Validierungsmaßnahmen liegen in Abhängigkeit der Probenmatrix in der Verantwortung des Prüfleiters.

2.1 Parameterbezogene Methodenauswahl

Möglichkeiten:

- a) Amtliche Sammlung gemäß § 35 LMBG, Schweizer Lebensmittelbuch, Methodensammlung AOAC, DGF, DIN oder DEV etc.
- b) Modifikation einer amtlichen Methode (z.B. wegen Geräteausstattung)
- c) Übernahme einer in der Literatur beschriebenen Methode

2.2 Besprechung mit dem(n) jeweiligen Mitarbeiter(n)

2.3 Kalibrierung/Prüfung der zur Durchführung der Methode notwendigen Prüfmittel

(Regelung zur Gerätekalibrierung in den jeweiligen Geräteanweisungen)

2.4 Umfang der durchzuführenden Validierungsmaßnahmen

In Abhängigkeit der nach 2.1 ausgewählten Methode müssen unterschiedliche Validierungsmaßnahmen durchgeführt werden:

a) Übernahme von Methoden aus amtlichen Sammlungen - jeweils Bestimmung aus der Matrix :

- ◆ Prüfung auf Präzision
- ◆ Maß der Präzision: Berechnung der absoluten und relativen Standardabweichung aus den Daten einer Mehrfachbestimmung
- ◆ zusätzliche Prüfgröße: Angabe der Wiederholbarkeit »r« der jeweiligen Methode (soweit vorhanden)
- ◆ Prüfung der Meßunsicherheit
- ◆ Festlegung des Vertrauensbereiches mittels einer Mehrfachbestimmung :
- ◆ soweit notwendig: Prüfung der Linearität
- ◆ Festlegung des Regressionskoeffizienten, mindestens Dreipunkt-, anzustreben Fünfpunktkalibrierung :
- ◆ soweit möglich: Prüfung der Richtigkeit
- ◆ Standardaddition mit zertifizierten Reinsubstanzen: Prüfung der Wiederfindung
- ◆ Prüfung der Methode mit zertifiziertem Referenzmaterial :
- ◆ Teilnahme an Eignungsprüfungen, Laborvergleichsuntersuchungen

b) Modifikation einer Methode aus amtlichen Sammlungen - jeweils Bestimmung aus der Matrix-:

- ◆ Prüfungsmaßnahmen wie unter a)
- ◆ Plausibilitätsprüfung des Einflusses der Modifikation, ggf. Kalibrierung gegen zertifiziertes Referenzmaterial
- ◆ Prüfung der Robustheit der Methode unter den gewählten Bedingungen
- ◆ bei umfangreichen Modifikationen ist diese Methode wie eine aus der Literatur übernommene Methode anzusehen

c) Methodenübernahme aus der Literatur

- ◆ Prüfung der beschriebenen Spezifität und Selektivität der Methode
- ◆ Bestimmung zunächst mit Reinsubstanzen bzw. Standards, anschließend Bestimmung aus der Matrix :
- ◆ Festlegung des Meßbereiches - Bestimmung aus der Matrix : Bestimmung des Konzentrationsbereiches, für den quantitative Aussagen gemacht werden können
- ◆ Prüfparameter wie unter a)
- ◆ soweit möglich: Überprüfung mit einem 2. unabhängigen Verfahren
- ◆ soweit notwendig: Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenze - Bestimmung aus der Matrix
- ◆ Prüfung der Robustheit der Methode unter den gewählten Bedingungen

d) Entwicklung einer hauseigenen Methode

- ◆ Prüfung der Spezifität und Selektivität der Methode
- ◆ Bestimmung zunächst mit Reinsubstanzen bzw. Standards anschließend Bestimmung aus der Matrix :
- ◆ Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen aus der Matrix
- ◆ Festlegung des Meßbereiches - Bestimmung aus der Matrix -:
- ◆ Bestimmung des Konzentrationsbereiches, für den quantitative Aussagen gemacht werden können :
- ◆ Prüfungsparameter wie unter a)
- ◆ soweit möglich: Überprüfung mit einem 2. unabhängigen Verfahren
- ◆ Prüfung der Robustheit der Methode unter den gewählten Bedingungen

2.5 Für qualitative Bestimmungen reduziert sich der Validierungsaufwand in der Regel auf folgende Faktoren:

- ◆ Prüfung der Spezifität bzw. Selektivität soweit es sich nicht um Methoden aus amtlichen Sammlungen handelt
- ◆ Bestimmung der Nachweisgrenze des Bestimmungssystems
- ◆ Bestimmung der Nachweisgrenze in der Probenmatrix
- ◆ Prüfung der Robustheit der gewählten Bestimmungsmethode zur Festlegung bestimmter Prüfhinweise

2.6 Erstellung und Freigabe einer Prüfanweisung

Die einzelnen Validierungsmaßnahmen werden dokumentiert und beim Prüfleiter verfügbar gehalten. Der Prüfleiter stellt aufgrund der ihm vorliegenden Ergebnisse fest, ob die gewählte Methode für die beabsichtigte Verwendung geeignet ist. Der Prüfleiter gibt die Prüfmethode in Form einer Prüfanweisung für das Labor frei.

3. Methoden zum Erregernachweis (einschließlich Nachweis von Erreger-spezifischen Antigenen und Nukleinsäuren)

Dieses Beispiel gibt einen umfassenden Überblick über die möglichen Validierungsschritte. Selbstverständlich ist dieses Beispiel nicht als starre Vorgabe zu betrachten, nach der in jedem Fall zu verfahren ist. Die erforderlichen Validierungsschritte sind vielmehr an der jeweiligen Aufgabenstellung zu orientieren, so daß in manchen Fällen nicht alle der aufgeführten Schritte durchgeführt werden müssen oder auch andere möglich sind. Die durchzuführenden Validierungsschritte liegen in der Verantwortung des Prüfleiters. Jede Methode, mit der Ergebnisse erzielt werden, die Kunden übermittelt werden, muß validiert sein. Allerdings kann ein Gefälle im Validierungsaufwand bestehen, der bei Hausmethoden hoch und bei anerkannten Standardmethoden niedriger zu veranschlagen ist.

Offizielle Verfahren oder Verfahren nationaler / internationaler Normenorganisationen benötigen nicht unbedingt eine vollständige Validierung (EA 10/4 bzw. EAL G18, 8.2). Bei der Nutzung kommerzieller Reagenziensätze (amtlich zugelassene Testkits) erfordern keine weitere Validierung, sofern Validierungsdaten aus alternativen Quellen verfügbar sind. Laboratorien sollten von den Herstellern die Herausgabe der Validierungsdaten und den Nachweise verlangen, daß die Validierung normenkonform durchgeführt wurde (s. auch EA 10/4 bzw. EAL G18, 8.3). Eine ISO 9000-Zertifizierung des Herstellers garantiert keine normenkonforme Validierung der Testkits. Die Verantwortung dafür, daß die verwendeten Methoden in der im Labor durchgeführten Weise zwecktauglich sind, liegt in jedem Falle beim Prüfleiter.

3.1 Methodenauswahl/-beschreibung

- a) Standardmethoden (amtliche und anerkannte Methoden: zum Beispiel nach EU-Regelungen, nationalem Recht, Bundesmaßnahmenkatalog Tierseuchen)
- b) modifizierte Standardmethoden
- c) Literatur- und Hausmethoden

3.2 Schulung der Mitarbeiter

3.3 Prüfung der zur Durchführung der Methode erforderlichen Prüfmittel

- a) Geräte (gemäß Geräteanweisungen):
zum Beispiel temperaturgeregelter Geräte, Pipetten
- b) Material (gemäß Prüfanweisungen): zum Beispiel Nährmedien, Reagenzien, Testkits (zum Beispiel Ergebnis der Chargenprüfung; interne Chargenprüfung, beispielsweise anhand von Referenzseren, falls erforderlich; Vergleich der benutzten Chargen)

3.4 Umfang der durchzuführenden Validierungsmaßnahmen (vergl. EN ISO/IEC 17025)

a) Standardmethoden:

- ◆ Richtigkeit (zum Beispiel Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen, Vergleich mit Referenzmaterial)
- ◆ Präzision (zum Beispiel Aliquots derselben Probe an 20 Tagen untersuchen, dann Mittelwert und Variationskoeffizient bestimmen)
- ◆ Nachweisgrenze (zum Beispiel Prüfung mit definierten Erreger-/Keimgehalten)
- ◆ Spezifität (zum Beispiel Prüfung mit Referenzstämmen), sofern erforderlich

b) Modifizierte Standardmethoden:

- ◆ Richtigkeit (zum Beispiel Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen, Vergleich mit Referenzmaterial)
- ◆ Nachweisgrenze (zum Beispiel Prüfung mit definierten Erreger-/Keimgehalten)
- ◆ Präzision (zum Beispiel Aliquots derselben Probe an 20 Tagen untersuchen, dann Mittelwert und Variationskoeffizient bestimmen)
- ◆ Spezifität (zum Beispiel Prüfung mit Referenzstämmen), sofern erforderlich
- ◆ Plausibilität (zum Beispiel Vergleich mit der nicht modifizierten Methode, Darlegung der wissenschaftlichen Erfahrung und Kenntnisse zu der Methode), sofern erforderlich

c) Literatur- und Hausmethoden:

- ◆ Richtigkeit (zum Beispiel Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen, Vergleich mit Referenzmaterial)
- ◆ Nachweisgrenze (zum Beispiel Prüfung mit definierten Erreger-/Keimgehalten)
- ◆ Präzision (zum Beispiel Aliquots derselben Probe an 20 Tagen untersuchen, dann Mittelwert und Variationskoeffizient bestimmen)
- ◆ Spezifität (zum Beispiel Prüfung mit Referenzstämmen), sofern erforderlich
- ◆ Plausibilität (zum Beispiel Vergleich mit der nicht modifizierten Methode, Darlegung der wissenschaftlichen Erfahrung und Kenntnisse zu der Methode)

3.5 Erstellung und Freigabe einer Prüfanweisung

Die einzelnen Validierungsmaßnahmen werden dokumentiert und beim Prüfleiter verfügbar gehalten. Der Prüfleiter stellt aufgrund der ihm vorliegenden Ergebnisse fest, ob die gewählte Methode für die beabsichtigte Verwendung geeignet ist.

Der Prüfleiter gibt die Prüfmethode für das Labor frei.

4. Methoden zum Nachweis einer Erreger-spezifischen Immunantwort (Antikörperbestimmungen, Serologie)

Dieses Beispiel gibt einen umfassenden Überblick über die möglichen Validierungsschritte. Selbstverständlich ist dieses Beispiel nicht als starre Vorgabe zu betrachten, nach der in jedem Fall zu verfahren ist. Die erforderlichen Validierungsschritte sind vielmehr an der jeweiligen Aufgabenstellung zu orientieren, so daß in manchen Fällen nicht alle der aufgeführten Schritte durchgeführt werden müssen oder auch andere möglich sind. Die durchzuführenden Validierungsschritte liegen in der Verantwortung des Prüfleiters. Jede Methode, mit der Ergebnisse erzielt werden, die Kunden übermittelt werden, muß validiert sein. Allerdings kann ein Gefälle im Validierungsaufwand bestehen, der bei Hausmethoden hoch und bei anerkannten Standardmethoden niedriger zu veranschlagen ist.

Offizielle Verfahren oder Verfahren nationaler / internationaler Normenorganisationen benötigen nicht unbedingt eine vollständige Validierung (EAL G18, 8.2). Bei der Nutzung kommerzieller Reagenziensätze (amtlich zugelassene Testkits) erfordern keine weitere Validierung, sofern Validierungsdaten aus alternativen Quellen verfügbar sind. Laboratorien sollten von den Herstellern die Herausgabe der Validierungsdaten und den Nachweise verlangen, daß die Validierung normenkonform durchgeführt wurde (s. auch EAL G18, 8.3). Eine ISO 9000-Zertifizierung des Herstellers garantiert keine normenkonforme Validierung der Testkits. Die Verantwortung dafür, daß die verwendeten Methoden in der im Labor durchgeführten Weise zwecktauglich sind, liegt in jedem Falle beim Prüfleiter.

4.1 Methodenauswahl/-beschreibung

- a) Standardmethoden (amtliche und anerkannte Methoden: zum Beispiel nach EU-Regelungen, nationalem Recht, Bundesmaßnahmenkatalog Tierseuchen)
- b) modifizierte Standardmethoden
- c) Literatur- und Hausmethoden

4.2 Schulung der Mitarbeiter

4.3 Prüfung der zur Durchführung der Methode erforderlichen Prüfmittel

Geräte (gemäß Geräteanweisungen): zum Beispiel temperaturgeregelte Geräte, Pipetten

Material (gemäß Prüfanweisungen): zum Beispiel Nährmedien, Reagenzien, Testkits (zum Beispiel Ergebnis der Chargenprüfung; interne Chargenprüfung, beispielsweise anhand von Referenzseren, falls erforderlich; Vergleich der benutzten Chargen)

4.4 Umfang der durchzuführenden Validierungsmaßnahmen

(s. auch ISO 17025):

In Abhängigkeit der nach 1. ausgewählten Methode müssen unterschiedliche Validierungsmaßnahmen durchgeführt werden:

a) Standardmethoden:

- ◆ Richtigkeit (Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen, Vergleich mit Referenzmaterial)
- ◆ Präzision (zum Beispiel Aliquots derselben Probe an 20 Tagen untersuchen, dann Mittelwert und Variationskoeffizient bestimmen)
- ◆ Streuungsmaße bei Mehrfachbestimmungen (Varianz, Standardabweichung)
- ◆ Nachweisgrenze (Prüfung mit definiertem Gehalt an Analyt oder mit Referenzseren)
- ◆ Bestimmung der diagnostischen Sensitivität (Anteil der Testpositiven an der Zahl der Wahr- oder „Goldstandard“positiven), falls nicht anderweitig verfügbar.
- ◆ Bestimmung der diagnostischen Spezifität (Anteil der Testnegativen an der Zahl der Wahr- oder „Goldstandard“negativen), falls nicht anderweitig verfügbar.

b) Modifizierte Standardmethoden:

- ◆ Richtigkeit (Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen, Vergleich mit Referenzmaterial)
- ◆ Präzision (zum Beispiel Aliquots derselben Probe an 20 Tagen untersuchen, dann Mittelwert und Variationskoeffizient bestimmen)
- ◆ Streuungsmaße bei Mehrfachbestimmungen (Varianz, Standardabweichung)
- ◆ Nachweisgrenze (Prüfung mit definiertem Gehalt an Analyt oder mit Referenzseren)
- ◆ Bestimmung der diagnostischen Sensitivität (Anteil der Testpositiven an der Zahl der Wahr- oder Goldstandardpositiven), falls nicht anderweitig verfügbar
- ◆ Bestimmung der diagnostischen Spezifität (Anteil der Testnegativen an der Zahl der Wahr- oder Goldstandardnegativen), falls nicht anderweitig verfügbar
- ◆ Plausibilität (zum Beispiel Vergleich mit der nicht modifizierten Methode, Darlegung der wissenschaftlichen Erfahrung und Kenntnisse zu der Methode), sofern erforderlich

c) Literatur- und Hausmethoden:

- ◆ Richtigkeit (Teilnahme an Laborvergleichsuntersuchungen, Vergleich mit Referenzmaterial)
- ◆ Präzision (zum Beispiel Aliquots derselben Probe an 20 Tagen untersuchen, dann Mittelwert und Variationskoeffizient bestimmen)
- ◆ Streuungsmaße bei Mehrfachbestimmungen (Varianz, Standardabweichung)
- ◆ Nachweisgrenze (Prüfung mit definiertem Gehalt an Analyt oder mit Referenzseren)
- ◆ Bestimmung der diagnostischen Sensitivität (Anteil der Testpositiven an der Zahl der Wahr- oder Goldstandardpositiven)
- ◆ Bestimmung der diagnostischen Spezifität (Anteil der Testnegativen an der Zahl der Wahr- oder Goldstandardnegativen)
- ◆ Plausibilität (zum Beispiel Vergleich mit einer anderen Methode, zum Beispiel einer Standardmethode, Darlegung der wissenschaftlichen Erfahrung und Kenntnisse zu der Methode)

4.5 Erstellung und Freigabe einer Prüfanweisung

Die einzelnen Validierungsmaßnahmen werden dokumentiert und beim Prüfleiter verfügbar gehalten. Der Prüfleiter stellt aufgrund der ihm vorliegenden Ergebnisse fest, ob die gewählte Methode für die beabsichtigte Verwendung geeignet ist.

Der Prüfleiter gibt die Prüfmethode in Form für das Labor frei.