

Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit: ein Vergleich zwischen mikrobiologischen Methoden und der ATP-Biolumineszenz

Die Überwachung der Lebensmittelhygiene im Sinne von HACCP („Hazard Analysis of Critical Control Points“) ist inzwischen jedem Lebensmittelhersteller ein Begriff, und viele werden meinen, sie implementieren schon Hygienepläne nach HACCP. In der Praxis aber gehen viele Hygienepläne nicht konform mit den international festgelegten Bestimmungen und Richtlinien, die von der *Codex Alimentarius Commission* herausgegeben wurden (Alinorm 97/13A). Dabei wird wahrscheinlich in der nahen Zukunft die Einhaltung der Codex-Bestimmungen Pflicht sein im internationalen Handel und in der Lebensmittelindustrie. Ein HACCP-Plan sollte integriert sein in die firmeneigenen Reinigungsprogramme und allgemeine Hygieneüberwachung. Die Definition mancher HACCP-Begriffe ist verständlicher als andere. So herrscht z.B. weitgehend Einigkeit über Bezeichnungen wie „Gefährdung“, „Risiko“ und „Überwachung“. Aber auch auf internationaler Ebene gibt es Uneinigkeit in Bezug auf Begriffe wie „Validierung“ und „Verifizieren“:

- „Überwachung“ (*monitoring*) bedeutet das Durchführen einer Reihe von geplanten Beobachtungen oder Messungen von Kontrollparametern mit dem Zweck, einen kritischen Kontrollpunkt (CCP) zu überprüfen.
- „Validierung“ (*validation*) besteht daraus, Beweise für die Effektivität eines HACCP-Planes zu sammeln.
- „Verifizieren“ (*verification*) ist das Anwenden von Methoden, Vorgängen, Tests und anderen Formen der Evaluierung (zusätzlich zu der Überwachung), um die gewünschte Einhaltung des HACCP-Planes zu belegen.

Für viele Lebensmittel, die für den sofortigen Verzehr bestimmt sind, wird die Sauberkeit der Oberflächen, die mit der Nahrung in direkten Kontakt kommen, ein für die Sicherheit kritischer Punkt sein. In Übereinstimmung mit den Richtlinien des Codex wird verlangt, dass kritische Grenzen und angestrebte Werte für die Reinigung spezifiziert und validiert werden. Die durchgeführten Kontrollen müssen nachgewiesenermaßen effektiv sein. Klassischerweise würden mikrobiologische Tests auf der Basis von Tupfern oder Kontaktplatten verwendet werden, und sie haben immer noch ihre Berechtigung in solchen Fällen, in denen ein spezifisches Pathogen nachgewiesen wird und entfernt werden muß. Die klassischen mikrobiologischen Methoden haben jedoch unübersehbare Nachteile: sie verlangen einen hohen Zeitaufwand und sie weisen sowohl in Bezug auf die Empfindlichkeit als auch auf die Reproduzierbarkeit erhebliche Mängel auf, besonders im unteren Konzentrationsbereich (Tabelle1).

Eigenschaft	Mikrobiologie	ATP-Biolumineszenz
Akzeptanz	Hohe Akzeptanz weltweit in der Lebensmittelindustrie	Hohe Akzeptanz in Großbritannien & Teilen von Europa, expandierend
Methode/Basisprinzip	Mikroorganismen werden von einer Oberfläche abgeklatscht und vermehrt	ATP aus Mikroorganismen & Lebensmitteln wird nach Enzymreaktion mit Luminometer analysiert
Testdauer	18-48 Stunden	2 Minuten
Empfindlichkeit mit Standardtest E. coli	10 ⁰ Zellen	10 ⁴ Zellen
Reproduzierbarkeit bei sauberen/grenzwertig sauberen Flächen	CV 60-191%	CV 19-31% (Biotrace XCEL und Clean-Trace)
Anforderungen an den Arbeitsplatz	Labor wird benötigt	Kein Labor nötig
Anforderungen an die Mitarbeiter	Mikrobiologische Ausbildung notwendig	Wenig bis gar kein Training notwendig

Tabelle 1. Vergleich mikrobiologischer und ATP-Biolumineszenz-Messungen

Klassische mikrobiologische Techniken spielen in einigen Situationen noch eine gewisse wichtige Rolle. Jedoch wird zunehmend aus Gründen der Zeitersparnis, Bequemlichkeit, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit der Messung der ATP-Biolumineszenz für die Reinigungs-Validierung der Vorzug gegeben (Abbildung 1). Zu beachten ist vor allem, dass ein Reinigungsvorgang vornehmlich als das Entfernen von Verunreinigungen betrachtet werden muss, also auch von Lebensmittelresten und nicht nur Mikroorganismen. Auch in diesem Zusammenhang ist die Überprüfung der Betriebshygiene mittels ATP-Biolumineszenz passender als eine rein mikrobiologische Methode.

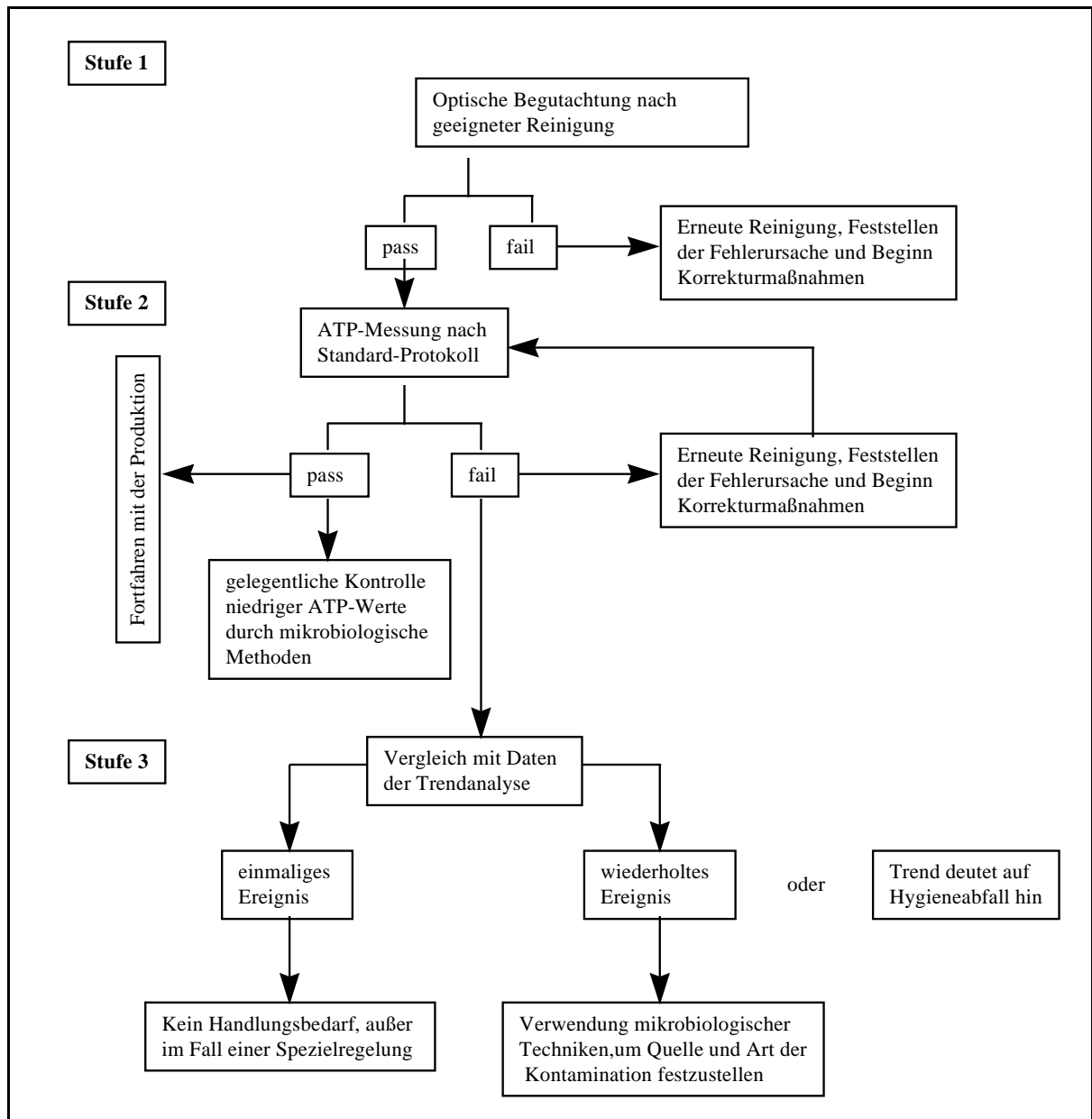


Abbildung 1. Stufen eines exemplarischen Hygieneüberwachungssystems im Sinne der HACCP

Lebensmittelhersteller sollten objektiv ihre Reinigungsprotokolle, Chemikalien und den Hergang der Reinigung selbst prüfen, um ein effektives und ökonomisch sinnvolles Hygienemanagement betreiben zu können. Diese Daten können dann für die Validierung verwendet werden. Das geeignete Reinigungsprogramm wird dann gezielt und regelmäßig angewandt, um die erreichbaren, effektiven Sollwerte und die kritischen Schwellenwerte festzustellen. Dieser Vorgang dient der Festlegung von Referenzschwellen, die in „relative light units“ (RLU) ausgedrückt werden.

Nachdem die Reinigungsprotokolle validiert und die geeigneten Referenzdaten bestimmt wurden, kann die Messung der ATP-Biolumineszenz für die tagtägliche Hygieneüberwachung eingesetzt werden. Damit wird dann die Effektivität der betrieblichen Standardreinigung kontrolliert, um sicher zu gehen, dass Schwellenwerte nicht überschritten werden. Die Revision der eingesetzten HACCP-Pläne ist eine Methode zur Verifizierung wirksamer Sicherheitsmaßnahmen. Bei solchen Revisionen kann die Messung der ATP-Biolumineszenz ein nützliches Werkzeug für die Überprüfung der Betriebshygiene sein. Auch ist es sinnvoll, die Ergebnisse der Routine-Hygienemessungen und Trendanalysen vorlegen zu können.

Die Reproduzierbarkeit der Messungen kann definiert werden als die Fähigkeit, bei gleichen Ausgangsbedingungen und gleichem Level an biologischer Belastung das gleiche Endergebnis zu erhalten, unabhängig von der Person, die den Test durchführt. Die Reproduzierbarkeit wird wiedergegeben durch den „coefficient of variation“ (CV) oder durch die relative Standardabweichung (SD). CV wird wie folgt berechnet:

$$CV = \frac{SD \times 100}{\text{Durchschnitt}}$$

Dabei wird die Standardabweichung SD als Prozentsatz des Durchschnitts ausgedrückt. Je *niedriger* CV, desto *besser* sind die Genauigkeit und somit die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Reproduzierbarkeit der Messungen feststellen zu können ist für die Validierung und Überwachung der Hygiene sehr wichtig, besonders wenn mehrere Personen die Proben der gereinigten Flächen entnehmen sollen.

Wurden Referenzschwellen festgelegt, und soll eine größere Anzahl von Mitarbeitern Proben nehmen, dann können eine schlechte Reproduzierbarkeit und mangelnde Genauigkeit ein Problem werden. Die Folge können entweder hohe Versagerraten (kritische Schwelle überschritten) oder das Festlegen einer übertrieben niedrigen Schwelle sein. Letzteres kann dazu führen, dass grenzwertig saubere Oberflächen doch noch als sauber akzeptiert werden. Die Gründe für einen solchen Mangel an Reproduzierbarkeit können im Versuchsaufbau selber begründet sein oder in einer unzureichenden Sorgfalt seitens der Mitarbeiter. Allerdings sollten Überwachungssysteme, die auf einer „one shot“-Methode beruhen, die Fehleranfälligkeit, besonders wenn technisch unversierte Mitarbeiter die Tests durchführen, sehr reduzieren. Wenn mit diesen Systemen noch Fehler passieren, dann am ehesten durch eine schlechte Wischtechnik bei der Probenentnahme.

Tabelle 2 veranschaulicht einige der Faktoren, die die Messergebnisse beeinflussen können und von den Mitarbeitern, die Proben nehmen, verstanden und beachtet werden müssen.

Größe der Fläche, die getestet werden soll
Drehung des Tupfers während der Probennahme
Gründlichkeit der Probennahme (Anzahl und Frequenz der Wischzüge über die Oberfläche)
Doppeltes Wischen (rechtwinklige Wischtechnik)
ausreichender Druck auf den Tupfer

Tabelle 2. Faktoren, die beim Wischtest zu beachten sind

Abbildung 2 zeigt die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die von sechs verschiedenen (qualifizierten und nicht-qualifizierten) Personen erhalten wurden bei Wischtests von a) 10 sauberen, b) 10 grenzwertig reinen Oberflächen. Die Oberflächen wurden mit einer niedrigen Standardmenge E. coli Bakterien angeimpft und wiederholt gemessen. Es wurden parallel sowohl ein klassisches mikrobiologisches Protokoll angewandt als auch ein „one shot“ ATP-Biolumineszenz Testsystem von der Firma Biotrace.

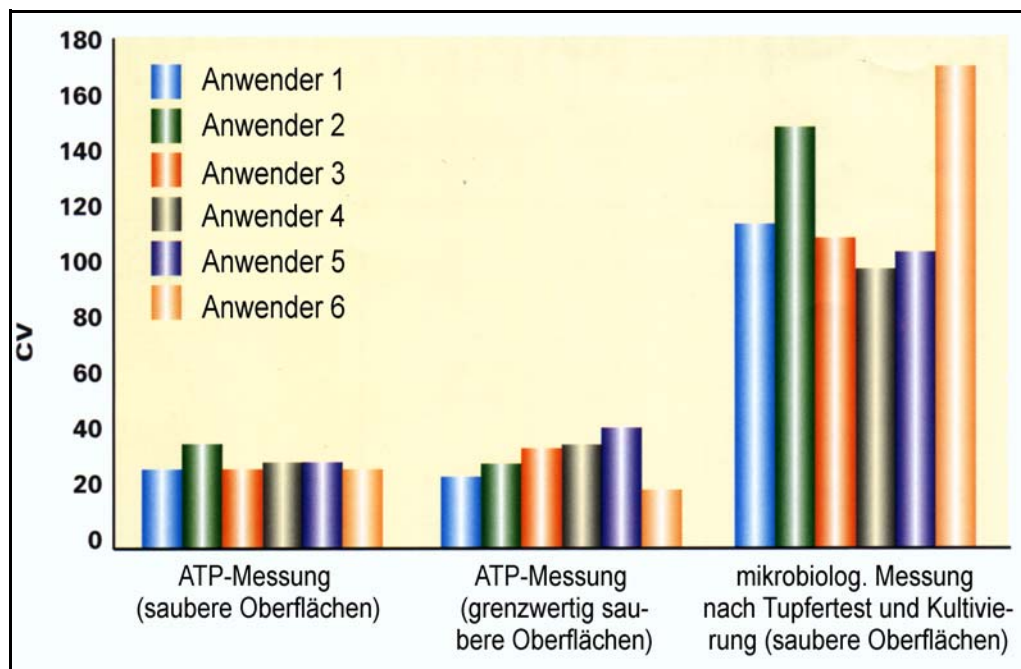


Abbildung 2. Vergleich der Reproduzierbarkeit mikrobiologischer und ATP-Biolumineszenz Messungen. Die Messungen wurden mit sauberen und grenzwertig sauberen Oberflächen von sechs verschiedenen Anwendern durchgeführt. ATP-Messungen wurden mit dem Clean-Trace System und Uni-Lite XCEL durchgeführt.

Es gab keinen Unterschied in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei den beiden Gruppen, qualifizierten und nicht-qualifizierten Personen. Nach der Auswertung dieser Testserie war deutlich, dass bei allen Anwendern die ATP-Messungen eine höhere Empfindlichkeit erreichten und eine überlegene Reproduzierbarkeit besaßen im Vergleich zu der traditionellen mikrobiologischen Tupfertechnik. Die Daten aus den ATP-Messungen waren weitestgehend konstant, wobei die Differenz zwischen den Testergebnissen einzelner Personen weniger als 7% betragen hat. Dies bildete einen starken Kontrast zu den mikrobiologischen Tests, bei denen die Differenz der CV-Werte bis zu 130% erreichte (siehe Abbildung 2). Solch hohe Unterschiede zwischen Messergebnissen lassen Zweifel an der grundsätzlichen Richtigkeit und Verlässlichkeit der Daten aufkommen.

Die überlegene Reproduzierbarkeit der ATP-Biolumineszenzmessung ist besonders für die Validierung und Beurteilung von HACCP-Plänen von unschätzbarem Wert. Reinigungsvorgänge und die Überwachung des Hygienemanagement kosten viel Geld und müssen nachweislich effizient sein. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen dass:

- Messungen der ATP-Biolumineszenz eine deutlich niedrigere Variabilität aufweisen als klassische mikrobiologische Methoden; dadurch ist dies die Technik der Wahl für die Überwachung des Hygienemanagement.
- Klassische mikrobiologische Oberflächentests als Ergänzung für ATP-Tests sinnvoll sind, besonders wenn die anvisierten Werte nicht erreicht wurden.
- ATP-Daten die betriebsinterne Qualitätssicherung und Trendanalyse unterstützen können.
- Verlässliche Daten durch Biolumineszenz-Messung gleichermaßen sowohl von qualifiziertem als auch von nicht-qualifiziertem Personal erhalten werden.

Übersetzt von der Firma IUL Instruments GmbH, Königswinter.

Dieser Überblick basiert auf der Arbeit von C. Griffith, C. Davidson und L. Fielding und wurde veröffentlicht in International Food Hygiene: Casting Light on Reproducibility.