

Doppelbestimmung in der Mikrobiologie

Hintergrund

Der Begriff Doppelbestimmung wird in den verschiedenen Fachdisziplinen unterschiedlich definiert. So findet sich in der *VDI Richtlinie 4203-Blatt 2 (2003) - Prüfprozeduren für Messeinrichtungen zur Messung gas- und partikelförmige Emissionen* - die folgende Definition:

Doppelbestimmung (Paired measurement):

Zeitgleich am selben Messort von denselben Personen durchgeführte Ermittlung von Messergebnissen mit zwei baugleichen Messeinrichtungen.

Für die Chemie gibt es eine Definition von IUPAC:

Replicate (duplicate) sample:

Multiple (or two) samples taken under comparable conditions. This selection may be accomplished by taking units adjacent in time or space. Although the replicate samples are expected to be identical, often the only thing replicated is the act of taking the physical sample. A duplicate sample is a replicate sample consisting of two portions. The umpire sample is usually used to settle a dispute; the replicate sample is usually used to estimate sample variability.

Source: PAC, 1990, 62, 1193 (Nomenclature for sampling in analytical chemistry (Recommendations 1990)) on page 1203

In der Mikrobiologie ist der Begriff der Doppelbestimmung nicht eindeutig definiert. Auch in verschiedenen mikrobiologischen Normen ist der Umgang mit der Doppelbestimmung uneinheitlich (s. Beispiele im Anhang); es sind zum eindeutigen Verständnis zusätzliche Informationen erforderlich.

Ziel

Das Dokument soll die Verwendung des Begriffs Doppelbestimmung in der Mikrobiologie definieren und weitere Begriffe bei der Verwendung von doppelten Schritten in der mikrobiologischen Untersuchung definieren und erklären.

Anwendungsbereich

Alle mikrobiologischen Untersuchungsmethoden

Systematische Unterscheidung

Anhand der verschiedenen Verfahrensschritte einer mikrobiologischen Untersuchung können die verschiedenen Fälle unterschieden werden (s. auch Abb. 1). Es muss genau angegeben werden, von welchem Verfahrensschritt an eine Dopplung erfolgt.

Definitionen:

1. Doppelprobe

Probenahme von zwei unabhängig gezogenen Proben, die nachfolgend einzeln dem gesamten Untersuchungsprozess unterworfen werden.

2. Vergleichsansatz

Vergleichsuntersuchung einer Probe durch Parallelansatz für zwei verschiedene Methoden, z. B. MPN und Koloniezahl durch Plattengussverfahren.

3. Doppelbestimmung

Einwaage zweier Teilproben aus einer Probe und nachfolgende Untersuchung dieser Teilproben mit derselben Methode*, **

4. doppelte Verdünnungsreihe

Doppelte Verdünnungsreihe bzw. Anreicherungen inklusive anschließender Inkubation unter identischen Bedingungen

5. Parallelbestimmung

Doppeltes Ausplattieren auf 2 identischen Nährmedien mit identischen Inkubationsbedingungen

Die Auswertung der verschiedenen Parallelbestimmungen erfolgt als Mittelwert aus den Einzelbestimmungen.

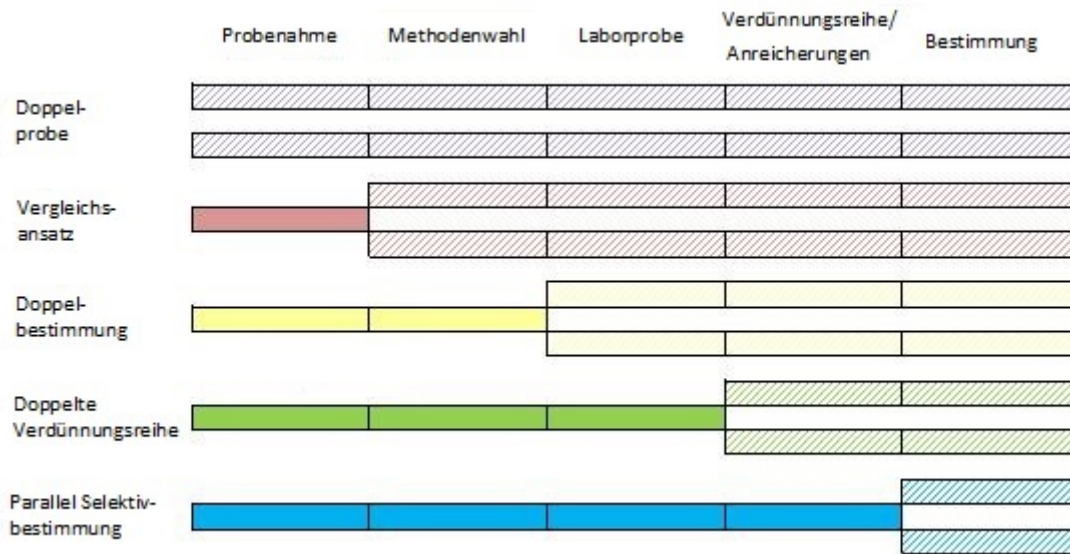


Abbildung 1

Der Untersuchungsaufwand hängt maßgeblich davon ab, ab welchem Verfahrensschritt die Untersuchungen doppelt durchgeführt werden. Andererseits können mit den verschiedenen doppelten Schritten unterschiedlich tiefe Messunsicherheitseinflüsse erkannt werden und damit die Sicherheit eines Endergebnisses erhöht werden.

Zur Klärung eines Untersuchungsauftrages ist zwischen Auftraggeber und Labor festzulegen, an welchen Stellen im Untersuchungsprozess eine Dopplung der Untersuchungsschritte vorzunehmen ist.

Welche Komponenten die Messunsicherheit bei den verschiedenen Bestimmungstypen beeinflussen, ist in der **Tabelle 1** zusammengestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Bestimmungstypen und die dabei erkennbaren Komponenten der Messunsicherheit

Bestimmungstyp	Erfasste Komponente der Gesamt-Messunsicherheit						
	Inhomogenität der Charge	Inhomogenität der Probe	Leistungsfähigkeit der Methoden	Kontaminationen bei der Analyse	Pipettieren beim Verdünnen	Pipettieren beim Ausplattieren	Auszählen der Kolonien
Doppelprobe	+	+	-	+	+	+	+
Vergleichsansatz	-	+	+	+	+	+	+
Doppelbestimmung	-	+	-	+	+	+	+
Doppelte Verdünnungsreihe	-	-	-	+	+	+	+
Parallelbestimmung	-	-	-	+	-	+	+

*"Dieselbe Methode" bedeutet „dasselbe Labor mit derselben Methodenbeschreibung und demselben Laborequipment und demselben Personal an demselben Tag und denselben Chargen der Nährmedien“.

**Der Begriff Doppelansatz wird in diesem Dokument mit Absicht nicht verwendet, da eine Vielzahl an interpretierten Bedeutungen vorhanden ist, die sich nicht zu einer Bedeutung zusammenführen lässt.

Anhang:

Normenübersicht

(mit freundlicher Genehmigung des DIN)

In untenstehenden Auszügen aus verschiedenen Normen wird ersichtlich, dass der Umgang mit dem Thema Doppelbestimmung in der Mikrobiologie nicht die gewünschte Aufmerksamkeit hinsichtlich einer einheitlichen Definition erhält, die ihr als grundlegendes Prinzip der Laboranalytik zusteht. Aus diesem Grund sind folgende Normen auszugsweise exemplarisch aufgeführt.

ISO 4833: Horizontales Verfahren für die Zählung von Mikroorganismen bei 30°C (Koloniezählverfahren)

8. Probenvorbereitung:

Die Probenvorbereitung erfolgt in Übereinstimmung mit dem entsprechenden Teil von ISO 6887 oder ISO 8261 und der spezifischen internationalen Norm, in der das betreffende Produkt behandelt wird. Falls keine spezifische internationale Norm vorliegt, sollen die beteiligten Seiten diesbezüglich eine Vereinbarung treffen.

9.1: Untersuchungsprobe, Erstverdünnung und weitere Verdünnungen:

Siehe ISO 6887 und die spezifische Internationale Norm, in der das betreffende Produkt behandelt wird.

9.2: Beimpfung und Bebrütung

9.2.1 Auf jede von 2 sterilen Petrischalen wird mit Hilfe einer sterilen Pipette 1 ml der Untersuchungsprobe bei flüssigem Ausgangsprodukt oder 1 ml Erstverdünnung im Fall sonstiger Produkte (Verdünnung 10^{-1}) überführt.

9.2.2 Auf jede von zwei weiteren sterilen Platten wird mit Hilfe einer anderen sterilen Pipette 1 ml der Verdünnung 10^{-1} (bei flüssigen Produkten) oder 1 ml der Verdünnung 10^{-2} (bei sonstigen Produkten) überführt.

ISO 16649-2 „Horizontales Verfahren für die Zählung von β -Glucuronidase-positiven *Escherichia coli*„

4.1 Zwei parallele Platten aus Trypton Galle Glucuronid-Medium (TBX) werden mit einer festgelegten Menge der Untersuchungsprobe oder der Erstverdünnung beimpft.

Unter denselben Bedingungen werden unter Verwendung der Dezimalverdünnungen der Untersuchungsprobe oder der Erstverdünnung zwei Platten je Verdünnungsstufe beimpft.

Die Platten werden für 18 bis 24h bei $44 \pm 1^\circ\text{C}$ bebrütet und anschließend untersucht, um das Vorliegen von charakteristischen Kolonien nachzuweisen, die als β -Glucuronidase *Escherichia coli* betrachtet werden können.“

DIN EN ISO 7218 „Allgemeine Anforderungen und Leitlinien für mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln“

9.2 Herstellung der Erstverdünnung und weiterer Verdünnungen

9.2.1 Allgemeines

„Die Erstverdünnung und die weiteren Verdünnungen sind nach den entsprechenden Teilen der ISO 6887 oder ISO 8261 herzustellen. Der Zeitraum zwischen dem Ende der Herstellung der Erstverdünnung und dem Überimpfen auf das Nährmedium darf 45 Minuten nicht überschreiten, außer wenn es in der betreffenden Internationalen Norm besonders festgelegt ist.

10.2.2 Anzahl der Petrischalen je Verdünnung

Für Keimzahlbestimmungen in der Lebensmittelmikrobiologie müssen von den Laboratorien, deren Qualitätssicherung die Anforderungen von ISO 17025 erfüllt, **eine Platte pro Verdünnung und mindestens 2 aufeinander folgende Verdünnungsstufen angelegt werden**. Wenn nur eine Platte angelegt wird oder wenn das Labor keine Qualitätssicherung hat, müssen 2 Platten entsprechend ISO 8199 benutzt werden.

ISO 6887-1 „Vorbereitung von Untersuchungsproben und Herstellung von Erstverdünnungen und von Dezimalverdünnungen für mikrobiologische Untersuchungen von Lebensmitteln

3.1 Definition Erstverdünnung:

„Suspension, Lösung oder Emulsion, die entsteht, wenn eine gewogene oder abgemessene Menge des zu prüfenden Produkts (oder einer aus dem Produkt hergestellten Untersuchungsprobe) mit der neunfachen Menge Verdünnungsflüssigkeit gemischt wird, wobei man eventuell vorhandene große Bestandteile absetzen lässt.

Anmerkung: Wenn es vorgesehen ist, mehrere Gruppen von Mikroorganismen in verschiedenen Nährmedien zu zählen, kann es erforderlich sein, einige oder alle Verdünnungsflüssigkeiten in Mengen über 9 ml aufzuteilen, die Größe der Kolben (6.4) oder Reagenzgläser (6.5) werden entsprechend festgelegt.

DIN EN ISO 6579 „ Horizontales Verfahren zum Nachweis von *Salmonella spp.* in Lebensmitteln“

9.1 Verweis auf ISO 6887-1 und ISO 8261