

---

Anleitung

## Inlabtec Serial Diluter: Verifizierung durch Methodenvergleich

### Einleitung

Alternativen zu bereits in einem Labor angewandten Methoden oder Techniken werden grundsätzlich mittels Vergleich überprüft (1). So wird sichergestellt, dass die alternative Methode beherrscht wird und dass die Resultate stimmen (2).

Die Einführung des Serial Diluters in ein Laboratorium entspricht der Einführung einer alternativen Verdünnungstechnik und ist somit mit der aktuell eingesetzten Verdünnungstechnik (z.B. Standardtechnik mit Reagenzgläsern) zu vergleichen. So wird sichergestellt, dass der Serial Diluter beherrscht wird und die erzielten Resultate stimmen.

Diese Anleitung ist ein Vorschlag, wie ein solcher Vergleich durchgeführt und ausgewertet werden kann, falls dazu nicht schon laborinterne Vorgaben existieren. Das Vorgehen und die statistische Auswertung der Resultate orientieren sich am „Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie“ der Schweizerischen Akkreditationsstelle, Dokument Nr. 328.dw, Ausgabe April 2013, Rev. 03

### Durchführung Methodenvergleich

#### Vergleich serieller Verdünnungstechniken durch das Plattenverfahren

Anhand der Resultate von Keimzahlbestimmungen von Lebensmittelproben (koloniebildende Einheiten (KBE)/g) durch das Plattenverfahren (Guss-, Spatel- und Tropftechnik) wird die Gleichwertigkeit des Serial Diluters gegenüber der bis anhin im Labor verwendeten Verdünnungstechnik überprüft.

Unter theoretisch idealen Bedingungen, ohne Variabilität und Messunsicherheiten, müssten gleichwertige Methoden für gleiche Proben die identischen Keimzahlen liefern und die Differenz der beiden Mittelwerte der bestimmten Keimzahlen aller Lebensmittelproben müsste null sein. Alle Analyseverfahren sind aber mit Variabilität und Messunsicherheit behaftet und verursachen entsprechende Abweichungen vom richtigen Mittelwert. Die Differenz des gemessenen zum richtigen Mittelwert wird als systematische Abweichung bezeichnet. Beim Vergleich der Gleichwertigkeit des Serial Diluters gegenüber der bis anhin verwendeten Verdünnungstechnik soll die systematische Differenz der Keimzahlbestimmungen in  $KBE/g \leq 15.4\%$  sein. Das entspricht der Wiederholgenauigkeit von 7.7 % des Plattenverfahrens multipliziert mit dem Erweiterungsfaktor  $k = 2$  für das 95 % Konfidenzintervall (3).

Für die Beurteilung der Übereinstimmung von Messmethoden ist die alleinige Berücksichtigung der systematischen Differenz nicht ausreichend. Zusätzlich berücksichtigt wird die Wiederholpräzision, die zufällige Abweichung der Werte um den Mittelwert. Aufgrund der Erfahrungen aus Ringversuchen (Proficiency Tests) lässt sich die Wiederholpräzision von Plattenverfahren abschätzen und beträgt erfahrungsgemäss  $\pm 0,5 \log KBE/g$  (1). Zudem gilt für den Vergleich von quantitativen Prüfverfahren: Zwei unter Wiederholbedingungen durchgeführte Ergebnisse unterscheiden sich mit 95%iger Wahrscheinlichkeit um weniger als die Wiederholgrenze  $r = 2,8 \cdot s_r$ , wobei  $s_r$  = Standardabweichung der unter Wiederholbarkeitsbedingungen erzielten Messresultate ist und der Faktor 2,8 sich wie folgt zusammensetzt:  $2 \cdot \sqrt{2}$  (Erweiterungsfaktor 2 für 95 % Konfidenzintervall und Wurzel 2 beruht darauf, dass sich  $r$  auf die Differenz von zwei einzelnen Prüfreihen bezieht) (1). Daraus gilt für die Standardabweichung  $s_r$  der Messwerte folgende Bedingung:  $2,8 \cdot s_r \leq 0,5 \log KBE/g$ .

Demzufolge ist die Gleichwertigkeit der Resultate nach der seriellen Verdünnung mit dem Serial Diluter gegenüber der bis anhin verwendeten Verdünnungstechnik bestätigt, falls die Differenz der Mit-

telwerte der Keimzahlbestimmungen  $\leq 15.4\%$  beträgt und  $r = 2.8$ -Standardabweichung  $s_r$  der Messwerte  $\leq 0.5 \log \text{KBE/g}$  ist.

### **Probenumfang**

Untersuchungsziel ist die Gleichwertigkeit von zwei Mischtechniken zu überprüfen. Dafür ist ein Vergleich der Verdünnungstechniken mit  $\geq 5$  Wiederholungen derselben 1:10 verdünnten und homogenisierten Probe durchzuführen. Dabei sollen die im Labor hauptsächlich untersuchten Probenmatrices berücksichtigt werden. Dabei genügen etwa 5 verschiedene Probenmatrices, da die ursprüngliche Probenmatrix in der Regel nach dem Homogenisieren keinen Einfluss mehr auf das Mischverhalten von 1:10 verdünnten Proben hat.

### **Auswertung der Messergebnisse**

**Die Verifizierung ist erfüllt**, falls die Differenz der Mittelwerte der Keimzahlbestimmungen  $\leq 15.4\%$  beträgt und  $2.8$ -Standardabweichung  $s_r$  der Messwerte  $\leq 0.5 \log \text{KBE/g}$  ist.

**Die Verifizierung ist nicht erfüllt**, falls die Differenz der Mittelwerte der Keimzahlbestimmungen  $> 15.4\%$  beträgt und  $2.8$ -Standardabweichung  $s_r$  der Messwerte  $\geq 0.5 \log \text{KBE/g}$  ist.

### **Vorlage für die Auswertung**

Eine passende Verifizierungsvorlage (Microsoft Excel) zum einfachen Auswerten der Messergebnisse ist auf unserer Webseite [www.inlabtec.com](http://www.inlabtec.com) (DE) verfügbar. Bei Bedarf die Probenanzahl anpassen durch Löschen und/oder Einfügen von Zeilen.

### **Zu beachten bei der Durchführung Methodenvergleich**

1. Der Methodenvergleich sollte durch dieselbe Person durchgeführt werden.
2. Die korrekte Funktionsweise des Serial Diluters muss sichergestellt sein. Die Prüfung ist in der Betriebsanleitung des Serial Diluters, Kapitel 9: Überprüfung dispensiertes Volumen, detailliert beschrieben.
3. Verwendung der gleichen Verdünnungslösung, Nährmedien und Pipetten.
4. Das Verdünnen und Ausplattieren der Lebensmittelproben ist mit beiden Methoden zeitnah durchzuführen d.h. keine Pause zwischen den beiden Methoden (Vermehrung der Mikroorganismen!) und muss innerhalb 45 Minuten nach der Probenhomogenisierung erfolgen.
5. Auf Grund von Erfahrungen wird die Verifizierung ohne Probleme erfüllt, wenn die Verdünnungstechniken beherrscht werden. Möglichst alle Personen, welche mikrobiologische Analytik betreiben und eine Verifizierung durchführen, sollten ihre Methodenkompetenz ausweisen können (Proficiency Test und/oder laborinterne Vergleiche).
6. Die Probenhomogenität und die Pipettiergenauigkeit sind für einen erfolgreichen Vergleich entscheidend. Untersuchungen zeigten, dass 50 % bis 70 % der Gesamtvarianz bei Vergleichen durch die Probeninhomogenität bedingt ist (1). Dieser Einflussfaktor lässt sich minimieren, indem aus der Erstverdünnung (Stomacherbeutel) zuerst das gesamte, für den Vergleich benötigte Probenvolumen in ein separates Reagenzglas transferiert wird. Dies minimiert Positionseffekte bei der Probenentnahme aus dem Beutel und sichert so homogene Proben, was die Präzision des Vergleichs erhöht.
7. Die Pipettiergenauigkeit lässt sich mit einer Analysenwaage bestimmen. Anhand von zehn 1 ml Pipettierungen kann die systematische Abweichung und die Standardabweichung bestimmt werden. Der maximale Fehler = Systematische Abweichung +  $2x$  Standardabweichung muss dabei  $\leq 2\%$  sein. Liegt der maximale Fehler darüber, müssen die Pipette und die Pipettiertechnik überprüft werden.

## Referenzen

1. Schweizerische Akkreditierungsstelle SAS: Leitfaden zur Validierung mikrobiologischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit im Bereich Lebensmittel- und Umweltmikrobiologie. SAS Dokument 328.dw, 2017-11, Rev.04
2. ISO/ IEC 17025: 2005 Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien
3. AOAC INTERNATIONAL: How to meet ISO 17025. Requirements for Method Verification. ALACC Guide, 2007.