

DIN EN ISO 13843



ICS 07.100.20

Entwurf

Einsprüche bis 2016-06-15
Vorgesehen als Ersatz für
DIN V ENV ISO 13843:2001-12

**Wasserbeschaffenheit –
Anforderungen zur Bestimmung von Leistungsmerkmalen von
quantitativen mikrobiologischen Verfahren (ISO/DIS 13843:2016);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 13843:2016**

Water quality –

Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods (ISO/DIS 13843:2016);

German and English version prEN ISO 13843:2016

Qualité de l'eau –

Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques quantitatives (ISO/DIS 13843:2016);

Version allemande et anglaise prEN ISO 13843:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-04-15 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an naw@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 134 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 13843:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Unterausschuss NA 119-01-03-03 UA „Mikrobiologie“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN ISO 13843 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Bezeichnung des Verfahrens:

Anforderungen zur Bestimmung von Leistungsmerkmalen von quantitativen mikrobiologischen Verfahren (K 2):

Verfahren DIN EN ISO 13843 — K 2

Änderungen

Gegenüber DIN V ENV ISO 13843:2001-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der bisherige Titel „Wasserbeschaffenheit - Richtlinie zur Validierung mikrobiologischer Verfahren“ wurde geändert in „Wasserbeschaffenheit – Anforderungen zur Bestimmung von Leistungsmerkmalen von quantitativen mikrobiologischen Verfahren“;
- b) die Struktur und der Inhalt der Norm wurde vollständig überarbeitet;
- c) die Anhänge wurden zum großen Teil vollkommen neu geschrieben;
- d) der bisher in diesem Dokument verwendete Begriff „Validierung“ wurde ersetzt durch „Methoden zur Charakterisierung und zur Verifizierung von mikrobiologischen Verfahren“.
- e) die vorliegende Norm ist die nationale Übernahme einer ISO-Norm; die frühere Vornorm war die nationale Übernahme eines ISO/TR (Technical Report).

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 8199	siehe	DIN EN ISO 8199
ISO 11133	siehe	DIN EN ISO 11133
ISO 17994	siehe	DIN EN ISO 17994

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft – eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker – gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Anforderungen zur Bestimmung von Leistungsmerkmalen von quantitativen mikrobiologischen Verfahren (K 2).

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „*Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Telefon 030 2601-2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 8199, *Wasserbeschaffenheit — Allgemeine Anleitung zur Zählung von Mikroorganismen durch Kulturverfahren*

DIN EN ISO 11133, *Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien*

DIN EN ISO 17994, *Wasserbeschaffenheit — Anforderungen für den Vergleich der relativen Wiederfindung von Mikroorganismen durch zwei quantitative Verfahren*

**Wasserbeschaffenheit — Anforderungen zur Bestimmung von
Leistungsmerkmalen von quantitativen mikrobiologischen Verfahren
(ISO/DIS 13843:2016)**

*Qualité de l'eau — Lignes directrices pour la validation des méthodes microbiologiques quantitatives
(ISO/DIS 13843:2016)*

*Water quality — Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods
(ISO/DIS 13843:2016)*

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.7g

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	5
Vorwort	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Grundbegriffe	8
4.1 Allgemeines	8
4.2 Charakterisierung	8
4.3 Verifizierung	9
4.4 Verfahrensvergleich	10
4.5 Proben	10
5 Spezifikationen: einige Richtlinien	11
6 Gestaltungen für die Bestimmung von Leistungsmerkmalen eines Verfahrens	12
6.1 Allgemeine Überlegungen	12
6.2 Berechnung der Sensitivität, Spezifität, Effizienz Selektivität, Falsch-Positiv-Rate und Falsch-Negativ-Rate	12
6.2.1 Typ und Anzahl der verwendeten Proben	12
6.2.2 Kategorische Leistungsmerkmale	13
6.2.3 Ausgearbeitetes Beispiel	14
6.3 Bestimmung der maximalen Obergrenze und Berücksichtigung der unteren Erkennungsgrenze	15
6.3.1 Obergrenze in Bezug auf Linearität	15
6.3.2 Verwendeter Probentyp	16
6.3.3 Ausgearbeitetes Beispiel	16
6.3.4 Die untere Nachweisgrenze	18
6.4 Präzisionsbewertung: Bestimmung der Wiederhol- und Vergleichpräzision	18
6.4.1 Allgemeines	18
6.4.2 Wiederholpräzision	18
6.4.3 Laborinterne Vergleichpräzision	20
6.5 Robustheit	22
6.5.1 Allgemeines	22
6.5.2 Experimentelle Gestaltungen für Auswirkungen aufgrund von Zeit und Temperatur	22
6.6 Relative Wiederfindung	23
6.6.1 Allgemeines	23
6.6.2 Bestimmung der relativen Wiederfindung	23
6.7 Zählunsicherheit	24
6.7.1 Allgemeines	24
6.7.2 Experimentelle Gestaltung für die Auswertung der Unsicherheit beim Auszählen der Kolonien	24
6.7.3 Beispiel einer individuellen (oder personellen) Unsicherheit beim Auszählen der Kolonien	24
6.7.4 Beispiel einer laborinternen Unsicherheit beim Auszählen der Kolonien	25
6.7.5 Beispiel einer laborinternen Unsicherheit beim Auszählen von MPN	26
7 Gestaltungen für die Verifizierung eines Verfahrens durch ein einzelnes Labor	27

7.1	Allgemeine Überlegungen	27
7.2	Berechnung der Sensitivität, Spezifität, Effizienz, Selektivität, Falsch-Positiv-Rate und Falsch-Negativ-Raten	27
7.2.1	Verwendeter Probenotyp	27
7.2.2	Anzahl der Proben.....	27
7.2.3	Verfahrensweise	27
7.2.4	Kategorische Leistungsmerkmale.....	27
7.3	Bestimmung der Wiederholpräzision	27
7.4	Zählunsicherheit.....	28
7.4.1	Allgemeines	28
Anhang A (informativ) Mathematische Variationsmodelle.....		29
A.1	Allgemeines	29
A.2	Grundsätzliche Ungenauigkeit von Koloniezählungen	29
A.3	Die intrinsische Präzision der MPN-Zählungen	30
A.3.1	Allgemeines	30
A.3.2	Einzelne MPN-Verdünnung.....	31
A.3.3	Mehrfache MPN-Verdünnung.....	32
A.4	Überdispersion.....	33
A.4.1	Allgemeines	33
A.4.2	Das negative binomische Modell	34
A.5	Nachweis von Überdispersion	35
A.6	Quantitative Bestimmung von Überdispersion.....	36
A.6.1	Anscombes-Verfahren I.....	36
A.6.2	Regressionsansatz.....	36
A.6.3	Index des Dispersions-$(\chi^2$ or G^2)Ansatz.....	36
A.6.4	Überdispersion auf dem Niveau des Nachweissystems	37
Anhang B (normativ) Bewertung der unteren Grenzen.....		38
B.1	Allgemeines	38
B.2	Nachweisgrenze auf Wahrscheinlichkeitsbasis	38
B.2.1	Poisson-Modell.....	38
B.2.2	MPN-Verfahren.....	39
B.2.3	Negatives Binomialmodell von Überdispersion	39
B.3	Bestimmungsgrenze auf Präzisionsbasis.....	40
B.3.1	Allgemeines	40
B.3.2	Gestaltungsuntergrenzen.....	40
Anhang C (normativ) Bewertung der Obergrenze		41
C.1	Allgemeines	41
C.2	Statistische Auswertung der Obergrenze.....	41
Anhang D (normativ) Bestimmung der operativen Veränderlichkeit bei Wiederholpräzision und laborinternen erweiterten Vergleichsbedingungen		42
D.1	Allgemeiner Fall: Statistische Auswertung in einem Wiederholpräzisionsexperiment.....	42
D.2	Allgemeiner Fall: Statistische Auswertung in einem laborinternen Wiederholbarkeitsexperiment für Koloniezählverfahren	43
D.3	Allgemeiner Fall: Statistische Auswertung in einem laborinternen Wiederholbarkeitsexperiment für MPN-Verfahren	44
Anhang E (normativ) Zählunsicherheit.....		46
E.1	Allgemeines	46
E.2	Statistische Bestimmung der Zählunsicherheit beim Auszählen und Auslesen von MPN.....	46
E.3	Individuelle (oder personelle) Unsicherheit beim Auszählen der Kolonien	47
E.4	Laborinterne Unsicherheit beim Auszählen der Kolonien	47
Anhang F (normativ) Bestimmung der operativen Veränderlichkeit (laborübergreifenden Vergleichpräzision) in einem Ringversuch zum Leistungsvergleich		48

F.1	Anforderungen für ein laborübergreifendes Präzisionsexperiment	48
F.2	Ausgearbeitetes Beispiel für Koloniezählverfahren	48
F.2.1	Bestimmung der individuellen und übergreifenden Dispersion unter Wiederholbedingungen.....	49
F.2.2	Bestimmung der laborübergreifenden Dispersion unter Wiederholbedingungen	49
F.2.3	Endgültige Formulierung der laborübergreifenden Präzisionsparameter des Verfahrens.....	50
F.3	Allgemeiner Fall für Koloniezählverfahren- statistische Auswertung für eine vorgegebene Probenreihe	50
F.3.1	Bestimmung der individuellen und übergreifenden Wiederholpräzision für die Laboratorien.....	52
F.3.2	Bestimmung der laborübergreifenden Komponente der Veränderlichkeit	53
F.3.3	Bestimmung der Werte u_0, r_2 und u_0, R_2	53
F.4	Ausgearbeitetes Beispiel für ein MPN-Verfahren.....	53
Anhang G (informativ) Begriffe		57
Anhang H (informativ) Glossar grundsätzlicher Symbole.....		62
Literaturhinweise.....		64

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 13843:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird ENV ISO 13843:2001 ersetzen.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 13843:2016 wurde vom CEN als prEN ISO 13843:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der WTO-Grundsätze zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: Foreword - Supplementary information.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 147, *Water quality*, Subcommittee SC 4. *Microbiological methods*

Diese erste Ausgabe annulliert und ersetzt die Ausgabe (ISO/TR 13843:2000), die technisch überarbeitet wurde.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm behandelt die Charakterisierung der biologischen Methoden. Im Rahmen dieses Dokuments bezeichnet die Charakterisierung die Parameteruntersuchung für eine Verfahrensbeschreibung zur Durchführung unter vorgegebenen Bedingungen, die als Leistungsmerkmale beschrieben werden können. Die Norm beschreibt Verfahrensabläufe für die Bestimmung der Leistungsmerkmale, die für eine anschließende Validierung oder Verifizierung der Verfahren verwendet werden können.

Die Betonung liegt auf den selektiven quantitativen Methoden und die Norm gilt für alle Wasserarten.

Verfahren, die als mikrobiologisch betrachtet werden, bei denen der quantitative Schätzwert auf der Auszählung von Partikeln beruht, entweder direkt mit Hilfe eines Mikroskops oder indirekt durch Wachstum (Vermehrung) in Kolonien oder Trübung. Die Grundlagen und Verfahrensabläufe in diesem Anwendungsbereich sind allgemein bekannt als direkte (mikroskopisch) Zählung, die wahrscheinlichste Zahl (MPN) und die Koloniezählung. Die meisten Verfahrensabläufe für die Bestimmung der Leistungsmerkmale, die in diesem Dokument beschrieben werden, gelten für alle drei Typen dieses Verfahrens. Wenn diese Verfahrensabläufe jedoch nicht anwendbar sind, werden alternative Vorschläge innerhalb dieses Dokuments oder in den Anhängen D und E gemacht (in Bezug auf Wiederhol- und Vergleichspräzision und Zählunsicherheit).

Plaques von Bakteriophagen ähneln in überwiegender Hinsicht den bakteriellen Koloniezahlen.

Einige der „neueren“ mikrobiologischen Verfahren, bei denen man sich der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bedient, können durch dieses Dokument ebenso abgedeckt werden, erfordern jedoch eine besondere Berücksichtigung, abhängig von ihrer Anwendungsweise. Wichtige Themen in diesen Situationen umfassen den Mechanismus der Bestimmung der Anzahl der vorhandenen Mikroben (z. B. Normkurve für qPCR oder mikroskopisches Auszählen für FISH) und die Lebensfähigkeit der erkannten Organismen. Wenn solche Techniken für eine Bestätigung als ein Teil des Verfahrens verwendet werden, sind alle Abschnitte dieses Dokuments relevant. Für Verfahren, die eine Erkennung der Zellkomponenten oder ihrer Stoffwechselprodukte umfassen, sollte die Anwendbarkeit dieses Dokuments aufgrund einer Einzelfallbetrachtung beurteilt werden.

Sollte es für die Charakterisierung der mikrobiologischen Verfahren nicht wesentlich sein, ist es vorteilhaft, Daten mit Organismen unter Stress zu erzeugen. Verschiedene Verfahren können angewandt werden, um die Organismen in Stress zu versetzen, die zwei nützlichsten für Wasser jedoch sind Stress durch Desinfektionsmittel (normalerweise Schädigung durch Chlor) und Nährstoffauszehrung, die durch Organismen verursacht wird, die vor der Prüfung eine Zeit lang in einer Umgebung mit niedrigem Nährstoffgehalt (d. h. Trinkwasser und andere oligotrophe Wasserarten) gelebt haben. Die Wirkung auf einige der Leistungsmerkmale bei „Strapazierung“ der Organismen hängt fast völlig von der Art und dem Grad der Strapazierung ab, daher ist die Aufnahme solcher Details in diese Norm unangemessen. Es gibt jedoch Beschreibungen in der Literatur, die Laboratorien befolgen können, im Falle, dass sie die Leistungsmerkmale eines Verfahrens mit strapazierten Zellen bestimmen möchten [17].

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 8199, *Water quality — General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture*

ISO 11133, *Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media*

ISO 17994, *Water quality — Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods*

3 Begriffe

Aufgrund der hohen Anzahl an Begriffen in diesem Dokument werden diese in Anhang G aufgelistet.

4 Grundbegriffe

4.1 Allgemeines

Mikroskopische Zellzahlen folgen, was die Partikelstatistik anbelangt, den gleichen Gesetzmäßigkeiten wie die Lebendzellzahlen, haben aber, mit Ausnahme der Mikrokolonieverfahren, nicht die biologischen Probleme, die mit dem Wachstum verbunden sind. Differenzierende Farbstoffe, spezifisch markierte Komplexe oder andere Verbindungen, die eingesetzt werden, um die Zielorganismen zu finden, ändern nichts an den Grundprinzipien. Es können die gleichen Grundsätze angewendet werden, wie für die selektiven Verfahren der Koloniezahlbestimmung. Die mathematische Basis für die Variante, die in all diesen Verfahrenstypen gefunden wurde, ist in Anhang A aufgeführt.

4.2 Charakterisierung

Die Charakterisierung eines mikrobiologischen Verfahrens beruht weitgehend auf der Untersuchung und der Formulierung der Leistungsmerkmale dieses Verfahrens.

Die Charakterisierung ist ein Prozess, bei dem Informationen über eine wahrscheinliche Leistung des Verfahrens unter besonderen Umständen gegeben werden. Es ist nicht die Absicht dieses Dokuments, Werte für Richtlinien für jedes spezifizierte Leistungsmerkmal abzugeben, sondern eher eine Richtlinie für die Bestimmung der Parameter und wie sie bestmöglich für Vergleiche abzuleiten sind. Verfahren, die „schlechte“ Leistungsmerkmale aufweisen, können immer noch nützlich sein.

Charakterisierung ist ein sondierender Prozess mit dem Ziel, die wahrscheinlichen Leistungsmerkmale eines neuen, modifizierten oder in anderer Weise unzureichend beschriebenen Verfahrens festzustellen. Sie sollte zu numerischen und beschreibenden Kenngrößen für die Leistungsfähigkeit führen und eine detaillierte und eindeutige Beschreibung des Nachweisziels beinhalten (wie positive Kolonie, Röhrchen oder Plaque). Die ermittelten Werte sollten jedoch nicht als Grenzen verwendet werden, da sie sich, abhängig vom Labor, der Matrix oder sogar von den spezifischen Proben verändern könnten.

Die Charakterisierung wird von einem einzelnen Labor in der ersten Instanz durchgeführt, um die wahrscheinliche Leistung eines Prüfverfahrens in einem spezifischen Labors zu bestimmen.

Eine gemeinschaftliche Studie über Verfahrensleistung kann als ein ergänzender Schritt durchgeführt werden, um die Leistungsmerkmale in einem Laborringversuch auszuwerten.

ANMERKUNG Ein Labor, das ein eigenes Verfahren oder eine Variante einer bestehenden Norm entwickelt, sollte die Charakterisierungsschritte durchführen.

Es ist unumgänglich, dass technische Angestellte, die an der Charakterisierung beteiligt sind, fundierte Erfahrungen mit anderen mikrobiologischen Verfahren aufweisen.

Die Leistungsmerkmale, die durch dieses Dokument abgedeckt sind, werden in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1 — Die in diesem Dokument beschriebenen Leistungsmerkmale

Parameter	Definition
Sensibilität ^{a, b, c}	Anteil der Gesamtpositivergebnisse, die in der mutmaßlichen Zählung richtig bestimmt wurden
Spezifität ^{a, b, c}	Anteil der Gesamtnegativergebnisse, die in der mutmaßlichen Zählung richtig bestimmt wurden
Falsch-Positiv-Rate ^{a, b}	Das Verhältnis der positiven Ergebnisse (z. B. typische Kolonien), die sich nachträglich als die Ursache für Nichtzielorganismen erweisen
Falsch-Negativ-Rate ^{a, b}	Das Verhältnis der negativen Ergebnisse (z. B. atypische Kolonien), die sich nachträglich als die Ursache für Zielorganismen erweisen
Selektivität ^{a, b, c}	Verhältnis der Zahl an Zielkolonien zur Gesamtzahl an Kolonien im Probevolumen
Effizienz ^{a, b}	Anteil der Gesamtkolonien, die in der mutmaßlichen Zählung richtig bestimmt wurden
Maximale Obergrenze ^a	Die Obergrenze des Arbeitsbereichs, für den das Verfahren nützlich ist
Wiederholpräzision ^{a, b, c}	Präzision unter Wiederholbedingungen (gleiche Bediener, gleiche Arbeitsbedingungen, kurze Zeitspanne ...)
Vergleichspräzision ^a	Präzision unter laborinternen erweiterten Vergleichsbedingungen ^d
Robustheit ^a	Eine Messung der Kapazität einer Prüfung, die durch kleine, aber absichtliche Veränderungen bei den Prüfbedingungen (z. B. Temperatur) unberührt bleiben soll.
Relative Wiederfindung ^a	Der Wirkungsgrad, mit dem ein Verfahren bei Vergleich mit einer anderen Verfahrensweise die Zielorganismen aus einer Probe wiederfindet
Zählunsicherheit ^{a, b}	Die relative Standardabweichung der Wiederholungszählungen des Ziels, die sich durch eine wiederholte Zählung ergeben hat (Teller, Röhrchen etc.), unter vorgeschriebenen Bedingungen (gleiche Person, verschiedene Personen, gleiches Labor etc.)
^a Erforderlich für die Bestimmung der Leistungsmerkmale. ^b Erforderlich für eine Verifizierung durch ein einzelnes Labor. ^c angegebene Leitfaden-Spezifikation ^d Verfahren für die Vergleichspräzision und Präzision zwischen mehreren Laboratorien werden in Anhang F beschrieben. Die Verwendung dieser Verfahrensweisen sollten dann berücksichtigt werden, wenn eine Leistung zwischen mehreren Laboratorien überragend ist, zum Beispiel, wenn die Verfahrensweisen zur Erfüllung gesetzlicher Auflagen entwickelt werden.	

4.3 Verifizierung

Die Verifizierung findet statt, wenn ein Labor beginnt, ein Verfahren anzuwenden, das woanders entwickelt wurde. Verifizierung konzentriert sich auf das Sammeln von Nachweisen, dass das Labor in der Lage ist, Leistungsdaten, die den in der primären Charakterisierung bestimmten ähneln, zu erzeugen. Es ist nicht hilfreich, die Grenzen auf die verschiedenen Komponenten der Verfahrenskarakterisierung festzulegen, da diese sich verändern können, abhängig von vielen Aspekten in Bezug auf Verfahren, Probenotyp und das durchführende Labor. Die Verifizierungsdaten sollten verwendet werden, um den Typ und die Qualität der Daten, die voraussichtlich vom Labor mit einer vorgegebenen Verfahrensweise und allen vorgegebenen Probenotypen erzeugt werden, festzulegen.

Üblicherweise benutzt die Verifizierung ausgewählte und vereinfachte Formen derselben Verfahren, die in der primären Charakterisierung verwendet wurden, aber möglicherweise über einen längeren Zeitraum durchgeführt wurden. Natürliche Proben sind das optimale Versuchsmaterial und die Untersuchungen brauchen nur die Aspekte der Verfahrensleistung anzusprechen, die für das Labor von Interesse ist.

4.4 Verfahrensvergleich

Die Verfahrenskenndaten setzen sich aus vielen Aspekten zusammen. Es gibt weder ein einzelnes Prüfverfahren noch numerische Kriterien dazu. Ein Verfahren kann, was die Spezifität betrifft, besser sein, aber schlechter in der Wiederfindung. Alle gesammelten Informationen zur Robustheit, Präzision und Spezifität, die während der Charakterisierungsprüfungen gewonnen wurden, können für Vergleichsvergleiche herangezogen werden. Die Verfahren müssen nur zum Vergleich der Wiederfindung parallel untersucht werden.

Es ist notwendig, zwei Verfahren parallel an denselben Proben anzuwenden, wenn ein laborspezifisches Verfahren entwickelt werden soll oder um Daten zu sammeln, die die Anwendung eines alternativen Verfahrens rechtfertigen sollen. Studien über alternative Verfahrensweisen zur relativen Wiederfindung im Vergleich zu einem Referenzverfahren, das gemäß ISO 17994 organisiert wurde, erfasst eine möglichst große Stichprobenspannweite und die Teilnahme durch eine Anzahl von Laboratorien, die eine Erweiterung der Stichprobenspannweite über große geographische Gebiete hinweg ermöglicht wurde. Manchmal jedoch kann es notwendig sein, die Ergebnisse einer Studie über alternative Verfahrensweisen zur Wiederfindung unter ökologischen Bedingungen oder in einem geographischen Bereich, der nicht im früheren gemeinschaftlichen Versuch der Laboratorien dargestellt wird. Wenn ein Labor nur das Vergleichsergebnis eines Verfahrens bestätigen muss, das bereits geprüft und offiziell anerkannt wurde, kann es die vorhergehenden Ermittlungsergebnisse in vollem Umfang nutzen. Das Labor sollte vollen Zugang zum Bericht des gemeinschaftlichen Vergleichs haben. Dementsprechend sollte es umfangreiche Schätzwerte der mittleren und der Standardabweichung der relativen Differenz haben. Die Formeln in 5.4.3 der ISO 17994 können angewandt werden, um die empfohlene Anzahl der Proben zu schätzen. Unabhängig jedoch vom Berechnungsergebnis sollte die Anzahl der Proben nicht weniger als dreißig betragen.

Ein Verfahren mit der höchsten Wiederfindung der bestätigten Zielorganismen ist offensichtlich das Beste, wenn bei routinemäßiger Anwendung eine Bestätigung erforderlich ist. Ein Verfahren mit etwas niedrigerer Wiederfindung, die dafür aber keine Bestätigung benötigt, ist eventuell vorzuziehen. Falls in der Charakterisierung beobachteten hohe Falsch-Negativ- oder Falsch-Positiv-Raten nicht durch verbesserte Definitionen der Zielkolonien oder andere Verfahrensweisen korrigiert werden können, kann das Verfahren als nicht verwendungsfähig beurteilt werden. Der Vergleich zweier mikrobiologischer Verfahren sollte einen Vergleich ihrer Leistungsmerkmale (d. h. Charakterisierung) zusammen mit einer Gegenüberstellung in Bezug auf Wiederfindung umfassen, bei der normalerweise kontaminierte oder aufgestockte Proben gemäß ISO 17994 verwendet werden.

4.5 Proben

Es ist ein beliebtes Konzept, dass die Charakterisierung und der Vergleich der Verfahren mit natürlichen Proben von natürlicher Mikrobekonzentration durchgeführt werden. Es ist konzeptionell gesehen ein guter Gedanke, unter bestimmten Umständen gibt es jedoch Ausnahmen.

Künstliche Proben (zertifizierte Referenzmaterialien und dotierte Proben) werden in internen und externen Qualitätssicherungsprogrammen verwendet, um die grundlegende Beherrschung des Verfahrens bei den an der Charakterisierung teilnehmenden Laboren sicherzustellen.

Dotierung kann bei der Verifizierung sinnvoll oder sogar notwendig sein, sobald es schwierig ist, natürliche Proben mit Zielorganismen zu finden. Der optimale Konzentrationsbereich für die Validierung mikrobiologischer Verfahren ist enger als ihr geplanter Arbeitsbereich. Hohe Konzentrationen sind nicht notwendig. Sie ähneln Reinkulturen und stellen die Leistungsfähigkeit des Verfahrens oder des Labors nicht auf die Probe.

Proben mit sehr niedrigem Bakteriengehalt müssen aus Gründen der Volksgesundheit untersucht werden, sind aber für Vergleichsverfahren und andere Validierungsverfahren aus statistischen Gründen ungeeignet. Ihre Verwendung ist jedoch in vielen Situationen unvermeidbar. Insbesondere dort, wo ein Verfahren die Identifizierung von zwei Typen von Zielorganismen auf der Probenplatte erlaubt (z. B. gesamt-koliforme Bakterien und *E. coli*), ist eine niedrige Anzahl an Organismen üblicherweise unvermeidbar.

Die Anzahl und Vielfalt von untersuchten Proben sollte ausreichend sein. Es gibt keine objektiven Verfahren, dies zu entscheiden, ohne die Statistik zu Hilfe zu nehmen. In einigen Fällen mag die erste untersuchte Probe das Ergebnis bringen, dass das Verfahren nicht gut genug ist. Üblicherweise werden aber mehr Proben benötigt. Die Auswahl zu weniger Proben kann nicht zu repräsentativen Ergebnissen führen.

Spezifische Richtlinien über Anzahl und Typen von Proben (zusammen mit ihrem mikrobiellen Gehalt) werden in 6.2.1 angegeben.

5 Spezifikationen: einige Richtlinien

Historisch gesehen, haben bisher die jetzigen Normen den Laboratorien wenig Hilfe bei ihrem Bestreben geboten, sodass sie das Verfahren richtig anwenden und gültige Ergebnisse erlangen. Es fehlt vor allem eine genaue Darstellung dessen, was Laboratorien tun sollten um zu verifizieren, dass das Verfahren ebenfalls bei ihnen korrekt funktioniert und wie eine gute von einer schlechten Leistungsfähigkeit unterschieden werden kann.

Ein Abschnitt über die Leistungsmerkmale muss zu allen ISO-Normen hinzugefügt werden, die Verfahren zur Wassermikrobiologie behandeln und sich auf die definierten Mikroben oder Mikrobengruppen beziehen.

Die äußere Aufmachung für Koloniezählverfahren könnte folgendes beinhalten:

- 1) **Sensitivität:** Allgemein größer als 90 %;
- 2) **Spezifität:** Allgemein größer als 80 %;
- 3) **Selektivität:** Ergebnisse sind nicht gültig, wenn die Selektivität weniger als 10 % beträgt.
- 4) **Zählunsicherheit:** Die individuelle Zählunsicherheit (eine Person) bleibt üblicherweise unter $u_{\text{rel}} = \pm 0,03$. Die Zählunsicherheit laborintern ist allgemein kleiner als $u_{\text{rel}} = 0,05$. Die Zählunsicherheit zwischen mehreren Laboratorien, die allgemein größer als 0,1 ist, deutet auf Probleme oder Schwierigkeiten hin.
- 5) **Wiederholpräzision (parallele Ausplattierung):** Streuung liegt innerhalb der Poisson-Verteilung. Falls nicht, sollte das Ausmaß an Überdispersion angegeben werden.
- 6) **Maximale Obergrenze:** Für Membranfilterverfahren ist die Spannweite üblicherweise bei 0 cfu bis 80 cfu angegeben, wohingegen die Spannweite bei Zählverfahren bei Ausplattierung, bei denen eine 90 mm Petrischale verwendet wird, bei 0 cfu bis 300 cfu reicht. Diese Obergrenzen hängen von der Ausweitung des Hintergrundwachstums (der Nichtzielorganismen), der Anzahl an verschiedenen Typen von Zielorganismen (z. B. gesamt-koliforme Bakterien und *E. coli*) und der Koloniegröße ab.

6 Gestaltungen für die Bestimmung von Leistungsmerkmalen eines Verfahrens

6.1 Allgemeine Überlegungen

Auch wenn es allgemein besser ist, die Proben zu verwenden, die auf natürliche Weise mit den Zielorganismen kontaminiert sind, erleichtert dies in einigen Fällen nicht die Bestimmung der Leistungsmerkmale. In diesen Fällen kann die Nutzung von zertifiziertem Referenzmaterial geeignet sein. Alternativ dazu können Proben mit bekannter Anzahl an Zielorganismen „dotiert“ sein, die aus im Handel erhältlichen Quellen stammen.

Welches Verfahren auch immer verwendet wird, um die Proben vorzubereiten, sollte auf die angemessene Mischung geachtet werden, um eine zufällige Verteilung der Organismen zu gewährleisten. Die gewünschte Anzahl an Zielorganismen in der Probe hängt zwar ab vom Verfahren, üblicherweise jedoch wird eine Spannweite von 10 bis 60 Kolonien als Einheit je Anteil einer Ermittlungsstichprobe praktisch sein. Die Anzahl ist ein Kompromiss zwischen einer gewünschten höheren Anzahl und der Kolonienanzahl, die praktisch für eine Membran oder Platte ist.

6.2 Berechnung der Sensitivität, Spezifität, Effizienz Selektivität, Falsch-Positiv-Rate und Falsch-Negativ-Rate

6.2.1 Typ und Anzahl der verwendeten Proben

Geeignete Proben werden vorbereitet, die 20 bis 80 Einheiten je Anteil einer Ermittlungsstichprobe der Gesamtkolonie enthalten. Die Proben werden dann durch das durchdachte Verfahren untersucht. Typische und atypische Kolonien (d. h. welche, die ein typisches Erscheinungsbild des Zielorganismus aufweisen und welche, die kein typisches Erscheinungsbild des Zielorganismus aufweisen) werden gezählt. Alle typischen und atypischen Kolonien werden identifiziert mit Hilfe eines geeigneten Verfahrens, das kommerziell verfügbare mikrobielle Identifizierungswerkzeuge, DNA-Sequenzen oder andere spezifizierten Verfahrensweisen umfasst.

Das Verfahren der Probenvorbereitung wird abhängig vom Verfahren und der Probenarten, die üblicherweise analysiert wird, variieren. Falls die auf natürliche Weise kontaminierten Proben mit einem geeigneten Maß an Zielorganismen zur Verfügung stehen, sollten diese auch verwendet werden. In manchen Fällen jedoch stehen die auf natürliche Weise kontaminierten Proben nicht zur Verfügung (z. B. für Verfahrensweisen, die für Trinkwasser entwickelt wurden), für solche Fälle kann ein im Labor dotiertes Material (bei Verwendung von geeigneten Quellen der Zielorganismen wie Flusswasser oder Schmutzwasser) verwendet werden, um die Proben vorzubereiten. Dies hat den Vorteil, die Nicht-Zielorganismen mit einzuschließen, die wahrscheinlich in kontaminiertem Wasser in einem ähnlichen Verhältnis wie in der „realen Welt“ gefunden werden.

Die Verwendung der Referenzmaterialien sollte vermieden werden, da die Auswahl der Stämme, die direkt verwendet werden, das Ergebnis des Experiments beeinflusst.

Eine Mindestanzahl an 20 Proben sollte aus verschiedenen Quellen verwendet werden. Bei Verwendung von Oberflächenwasser oder Schmutzwasser für die Vorbereitung des dotierten Materials sollte mindestens aus drei Quellen gewonnen werden. Die Durchführung dieser Arbeit, eine passende Anzahl von „atypischen“ Kolonien zu prüfen und zu untersuchen, die sich schwer finden lassen, ist wichtig, auch wenn das Verfahren sehr selektiv ist.

6.2.2 Kategorische Leistungsmerkmale

Die Identifizierungsdaten können dann in vier Kategorien unterteilt werden:

- a) Anzahl der typischen Kolonien, die als Zielorganismen bestätigt wurden (Echt-Positive);
- b) Anzahl der atypischen Kolonien, die als Zielorganismen bestätigt wurden (Falsch-Positive);
- c) Anzahl der typischen Kolonien, die als Nicht-Zielorganismen bestätigt wurden (Falsch-Positive);
- d) Anzahl der atypischen Kolonien, die als Nicht-Zielorganismen bestätigt wurden (Echt-Positive).

Diese Häufigkeiten können gut in einer 2×2 Tabelle ausgedrückt werden:

		Angenommener Zählwert		
		+	-	
Bestätigter Zählwert	+	a	b	a+b
	-	c	d	c+d
		a+c	b+d	n

Die Gesamtzahl der Prüfungen ist $a + b + c + d = n$.

Die Sensitivität, Spezifität, Selektivität, Falsch-Positiv-Rate und Falsch-Negativ-Raten der Zielorganismen werden wie folgt berechnet:

$$\text{Sensitivität} = a / (a+b)$$

$$\text{Spezifität} = d / (c+d)$$

$$\text{Falsch-Positiv-Rate} = c / (a+c)$$

$$\text{Falsch-Negativ-Rate} = b / (b+d)$$

$$\text{Selektivität} = a / n$$

Ein weiterer Parameter, Effizienz (E), der den Kolonieanteil angibt, der korrekt übergeben wurde, kann als $E = (a+d) / n$ berechnet werden.

ANMERKUNG Für MPN-Verfahren kann der gleiche Ansatz angewandt werden. Der Begriff „Kolonien“ kann zu „Aliquoten“, der Begriff „typisch“ zu „positiv“ und „atypisch“ zu negativ“ geändert werden.

6.2.3 Ausgearbeitetes Beispiel

Die Ergebnisse aus 20 Beispielen werden durch ein neu entwickeltes Ausplattierungsverfahren übernommen.

Tabelle 2 – Tabellarisierung der Zählungen für die kategoriale Merkmalsbestimmung

Probe	a	b	c	d
1	20	3	3	35
2	26	0	2	47
3	54	1	0	11
4	30	0	1	47
5	37	1	4	24
6	15	3	3	20
7	41	0	0	5
8	40	1	7	11
9	41	4	4	8
10	45	0	3	21
11	32	0	6	6
12	56	3	2	19
13	14	0	7	4
14	27	6	1	25
15	31	9	0	38
16	62	3	4	9
17	28	2	0	5
18	30	6	1	32
19	12	6	0	41
20	20	1	3	20
Summe	661	49	51	428

Die entsprechende Frequenztabelle kann bei Verwendung der Koloniesumme je Kategorie zur Verfügung stehen:

		Angenommener Zählwert		
		+	-	Summe
Bestätigter Zählwert	+	661	49	710
	-	51	428	479
Summe		712	477	1 189

Die folgenden Leistungsmerkmale können bestimmt werden:

Sensitivität = $661 / 710 = 0,931\ 0$ (93,1 %)

Spezifität = $428 / 479 = 0,893\ 5$ (89,4 %)

Falsch-Positiv-Rate = $51 / 712 = 0,071\ 6$ (7,2 %)

Falsch-Negativ-Rate = $49 / 477 = 0,102\ 7$ (10,3 %)

Selektivität = $661 / 1\ 189 = 0,555\ 9$ (55,6 %)

Effizienz = $(661+428) / 1189 = 0,915\ 9$ (91,6 %)

6.3 Bestimmung der maximalen Obergrenze und Berücksichtigung der unteren Erkennungsgrenze

Die Arbeitsspannweite des Verfahrens wird oft in der Originalbeschreibung der Verfahrensweise spezifiziert oder von Herstellern definiert bei Ermittlungen, die kommerziell erhältlich sind. Diese Bilder müssen jedoch nicht immer akkurat sein und können bei den verschiedenen Probentypen unterschiedlich sein.

Für MPN-basierte Verfahren wird die Arbeitsspannweite aus dem Stichprobenumfang und der Anzahl der verwendeten Röhrchen definiert. Die praktische Obergrenze wurde überschritten, wenn alle Röhrchen in allen Verdünnungen positiv sind.

6.3.1 Obergrenze in Bezug auf Linearität

Die Präzision der Koloniezählverfahren verbessert sich theoretisch stetig mit der Anzahl von Zielkolonien, die in der Nachweisreihe beobachtet wird. Die Obergrenzen sind durch den Platzbedarf und die sich daraus ergebenden Interaktionen der mikrobiellen Kolonien definiert.

In der Praxis haben Koloniezählverfahren eine Obergrenze pro Nachweissystem, die mit der Testsituation variiert. Das Nachweissystem der Koloniezählung (Agarplatte, Membranfilter) kann aus mehreren Gründen, von denen die Anzahl der Zielkolonien nur einer ist, „verstopft“ oder gesättigt sein.

Jedes Verfahren besitzt eine obere zuverlässige Grenze. Sie ist keine genau festgelegte Zahl, sondern ein Bereich von Koloniezahlen, bei denen die Koloniezählung pro Platte zu unsicher wird, um darauf eine gültige Bestimmung stützen zu können.

Ein Versuchsaufbau, der auf fein abgestuften Verdünnungs- oder Voluminareihen mit paralleler Wiederholung der Ausplattierung und Zählung beruht, liefert Daten zur Bestimmung der oberen Arbeitsgrenze.

Eine sorgfältig gemischte flüssige Probe wird auf eine Dichte vorverdünnt, die pro Platte eine Koloniezahl erwarten lässt, die die angenommene Obergrenze der Leistungsfähigkeit des Nachweissystems etwas überschreitet. Eine Reihe von sechs oder sieben weiteren Verdünnungen mit Verdünnungsstufen von 1:2 wird aus der Start suspension fortgeführt. Drei Parallelplatten werden von jeder Verdünnung beimpft.

Platten aus Verdünnungen, die durchschnittlich mehr als 20 Kolonien je Platte ergeben, werden abgelesen.

Die Daten werden auf Proportionalität und Überdispersion der Parallelen untersucht, unter der Annahme einer vollständigen Zufälligkeit bei jedem Schritt als Basis der Auswertung.

Ein Einzelwert der G^2 -Prüfung ist eher für eine eingeschränkte Verwendung. Die Durchführung von ähnlichen Verhältnisprüfungen bei verschiedenen Proben hilft, die höchste Koloniezahl zu bestimmen, bei der das Verhältnis des Verfahrens ausreichend ist.

6.3.2 Verwendeter Probentyp

Die Arbeitsspannweite eines Verfahrens kann durch Verwendung von natürlich kontaminierten Proben, Reinkulturen oder mit kontaminiertem Material dotierten Proben, die die Zielorganismen enthalten (z. B. Schmutzwasser für enterale Organismen), bestimmt werden. Die Untersuchung von einer Mindestanzahl von 20 Proben ist erforderlich.

Bei Verwendung von Schmutzwasser oder Oberflächenwasser sollten mindestens drei Quellen verwendet werden.

ANMERKUNG 1 Die Bestimmung der Arbeitsspanne kann für Verfahren kompliziert werden, bei denen zwei Zielorganismen auf der gleichen Platte gesucht werden, zum Beispiel der gleichzeitige Nachweis von gesamtkoliformen Bakterien und *E. coli* auf einem Einzelmembranfilter. Unter solchen Umständen kann die Arbeitsspanne für die in der Probe bestehenden gesamtkoliformen Bakterien und *E. coli* mit anderen gesamtkoliformen Bakterien unterschiedlich sein. Bei Bestimmung der Arbeitsspanne für diese Verfahrenstypen könnte die Arbeitsspanne berichtet werden als die Gesamtanzahl der Zielkolonien, da die Rate von *E. coli* zu anderen koliformen Bakterien von Probe zu Probe variiert.

ANMERKUNG 2 Ein weiterer Störfaktor bei der Bestimmung der Arbeitsspanne ist die Selektivität des Verfahrens. Beispielsweise kann ein membranfilterbasiertes Verfahren für den Nachweis von gesamtkoliformen Bakterien und/oder *E. coli* mit einer schlechten Selektivität anderen Nichtzielorganismen ein Wachstum ermöglichen. Das Wachstum dieser Organismen kann das Wachstum der Zielorganismen verschleiern oder verhindern. In solchen Fällen könnte die Arbeitsspanne hinsichtlich der absoluten Anzahl der Ziel- und Nichtzielkolonien auf der Membran angegeben werden, da die Arbeitsspanne durch das Wachstum der Nichtzielorganismen bedeutend beeinträchtigt wird,

6.3.3 Ausgearbeitetes Beispiel

Ein natürliche Probe wurde auf ein geeignetes Ausgangsniveau vorverdünnt und eine Verdünnungsreihe mit sechs aufeinanderfolgenden Stufen im Verhältnis von 1:2 wurde vorbereitet.

Von jeder Verdünnung wurden drei Parallelplatten durch Ausplattierung im Oberflächenverfahren angefertigt. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Kolonien ausgezählt.

Tabelle 3 – Tabellarisierung der Zählungen in einer Linearität

Verdünnung	Parallelzählungen			Summe	Mittelwert	Relatives Volumen	
				S_i	$\bar{x}$	R_i	S_i/R_i
2 ⁻¹	121	204	162	487	162,3	32	15,22
2 ⁻²	109	128	148	385	128,3	16	24,06
2 ⁻³	111	114	97	322	107,3	8	40,25
2 ⁻⁴	56	60	68	184	61,3	4	46,00
2 ⁻⁵	36	29	24	89	29,7	2	44,50
2 ⁻⁶	11	13	17	41	13,7	1	41,00
			Gesamt:	1 508		63	—

ANMERKUNG Die Formel für die folgenden Berechnungen ist in Anhang C, Formel (C.1) angegeben.

6.3.3.1 Allgemeine Proportionalitätsermittlung

Die Vereinbarung der Zahlensumme von parallelen Kolonien mit den jeweiligen relativen Volumen 32/16/8/4/2/1 wird mit den Summen der parallelen und allgemeinen G^2 (Formel (C.1)) wie folgt berechnet
 $G_5^2 = 2 [487\ln(487/32) + 385\ln(385/16) + 322\ln(322/8) + 184\ln(184/4) + 89\ln(89/2) + 41\ln(41/1) - 1\,508\ln(1\,508/63)] = 292,526$.

Die Versuchsstatistik hat $6 - 1 = 5$ Freiheitsgrade. Der Wert der Ablesemarke wird mit der X^2 -Verteilung mit fünf Freiheitsgraden verglichen, die mit 11,070 für 5 % und 15,086 für 1 % entsprechen.

Der berechnete Wert übertrifft den theoretischen Wert um 1 % (15,086), was bedeutet, dass die allgemeine Linearität der Ergebnisse schlecht ist.

6.3.3.2 Datenauswertung und weitere Schritte

Das Nachweissystem war in dieser Probe im Koloniezahlbereich von $41/3 = 14$ bis $487/3 = 162$ Kolonien pro Platte nicht linear. Aus der Prüfung der Summen pro relativem Volumen ($S_i R_i$) kann beobachtet werden, dass die hohen Koloniezahlen am stärksten von der Erwartung abweichen. In den vier Verdünnungen von 2^{-3} auf 2^{-6} waren die Zählwerte je relativem Volumen ($S_i R_i$) etwa konstant, ungefähr 43 im Durchschnitt. Eine plötzliche Änderung zwischen Verdünnungen von 2^{-3} und 2^{-2} trat auf.

Das Nachweissystem wurde bereits bei weniger als 160 Kolonien pro Platte nicht-brauchbar, da weniger Kolonien als erwartet bei Verdünnungen von 2^{-2} und 2^{-1} gewachsen sind. Das Verhältnis 2:1 zwischen aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen wird nicht in den Koloniezählungen bei höheren Konzentrationen gesehen, was anzeigt, dass bei hohen Koloniekonzentrationen die Ergebnisse nicht linear sind.

Die gleiche Proportionalitätsanalyse kann ohne Zählungen der ersten Verdünnung wiederholt werden. Die Vereinbarung der Summen für fünf Verdünnungen wird wie folgt berechnet:

$$G_4^2 = 2 [385\ln(385/16) + 322\ln(322/8) + 184\ln(184/4) + 89\ln(89/2) + 41\ln(41/1) - 1\,021\ln(1\,021/31)] = 81,933.$$

Vier Freiheitsgrade der Referenzwerte für die Prüfgrößen sind 9,488 für 5 % und 13,277 für 1 %. Die Proportionalität war immer noch erheblich außer statistischer Kontrolle bei einem mittleren Zählwert von 128.

Der nächste Schritt ist die Proportionalitätsermittlung für vier Verdünnungen:

$$G_3^2 = 2 [322\ln(322/8) + 184\ln(184/4) + 89\ln(89/2) + 41\ln(41/1) - 636\ln(636/15)] = 2,328.$$

Die Referenzwerte für vier Freiheitsgrade von 7,815 für 5 % und 11,345 für 1 % sind viel höher als die beobachteten 2,328. Es bleiben keine Anzeichen einer systematischen Abweichung von der Proportionalität in den vier Verdünnungen zurück, beginnend mit dem mittleren Zählwert von 107.

Es kann daraus geschlossen werden, dass eine Linearität nur erkannt werden kann, da die Probe verdünnter wird. Der Punkt, an dem die Linearität nicht erkannt wird, bald nachdem die Anzahl der Kolonien je Platte größer als 100 wird, bestimmt die Obergrenze des Verfahrens.

Ein ähnlicher Versuchsplan sollte mit einer Mindestanzahl von zwanzig Proben zur Bestimmung der Arbeitsbereich wiederholt werden.

ANMERKUNG Der Ansatz ist nur bei Verfahren zur Koloniezahlbestimmung anwendbar.

6.3.4 Die untere Nachweisgrenze

Die untere Grenze des Nachweises kann nicht zuverlässig durch Experimentiermethoden bestimmt werden und ist größtenteils eine Sache der Definition und des analysierten Probenvolumens. Eine detaillierte Erklärung wird in Anhang B gegeben.

6.4 Präzisionsbewertung: Bestimmung der Wiederhol- und Vergleichpräzision

6.4.1 Allgemeines

Die Normenreihe ISO 5725 wurde als ein Richtliniendokument zur Charakterisierung der Veränderlichkeit der normierten Messverfahren entwickelt. Zwei Messwertstreuungen (oder -präzision), Wiederholpräzision und Vergleichpräzision werden in vielen Disziplinen als repräsentative Daten in Messverfahren akzeptiert.

Die Charakterisierung eines neuen Verfahrens sollte die ursprünglichen Werte ihrer Präzisionsschätzungen angeben. Andere Laboratorien benötigen diese Information für ihre Verifizierung des Verfahrens und nachfolgend zur Etablierung der analytischen Qualitätskontrollsysteme.

Geltend für die mikrobiologischen Wasserverfahren benötigen ISO 5725-1, ISO 5725-2 und ISO 5725-3 einige Anpassungen, da die Grundsätze ursprünglich für eine kontinuierliche Datenerfassung und nicht für diskrete Daten (Zählwerte) gelten.

Die hauptsächlichen Präzisionsstufen werden allgemein in zwei Zuständen ausgewertet:

- die Wiederholbedingungen, die sich auf die Variabilität unter den Messungen beziehen, die an identischen Proben unter identischen Verhältnissen durchgeführt wurden. In idealen Fällen von mikrobiologischen Bestimmungen, werden diese Analysebedingungen erwartet, um eine Poisson-Verteilung zu befolgen. In der Praxis ist dies nicht immer der Fall, Fälle von Überdispersion können durch Experimente zwischen parallelen Zählungen nachgewiesen werden (siehe Anhang D);
- die erweiterten Vergleichsbedingungen, die sich auf die Variabilität unter den Messungen beziehen, die an identischen Proben unter verschiedenen Verhältnissen von verschiedenen Laboratorien mit den gleichen Messverfahren durchgeführt wurden. Theoretisch gesehen, umfasst die Vergleichspräzision Auswirkungen, die durch Unterschiede bei Instrumenten, Reagenzien, Bedienern, Laboratorien und Umweltbedingungen verursacht werden. Die Beurteilung der Stufenmessgenauigkeit für mikrobiologische Verfahren führt zu einer relativen operativen Veränderung, was die maximalen Veränderungsfaktoren der Messunsicherheit umfasst (siehe Anhang F).

Eine dritte Messgenauigkeit eines Verfahrens kann in einem Laboratorium mit spezifischer experimenteller Planung beurteilt werden (Zerlegung einer systematischen Abweichung in elementare Bestandteile wie Bediener, Ausrüstung, Materialeinfluss ...). Dies ist als Vergleichspräzision zwischen Laboratorien oder Präzision unter Zwischenbedingungen bekannt (für detaillierte Angaben siehe 6.4.3 und Anhang D).

ANMERKUNG 1 Wiederholpräzision wird allgemein durch doppelte (oder mehrfach wiederholte) Messungen durchgeführt.

6.4.2 Wiederholpräzision

Die Gestaltung für die Bestimmung der Wiederholpräzisionsleistung eines Verfahrens besteht aus 10 Replikaten der gleichen Probe, die unter Wiederholpräzisionsbedingungen analysiert wurden, d. h. durch den gleichen Techniker am gleichen Tag, etwa zur gleichen Zeit und alle im Inkubator bebrüteten Proben.

Eine Mindestanzahl von drei Datensätzen der Wiederholpräzision sollte unter Verwendung von Zielorganismen aus verschiedenen Quellen vorbereitet werden. Natürliche Proben werden bevorzugt verwendet.

6.4.2.1 Ausgearbeitetes Beispiel: Tabellarisierung der Zählwerte

3 aus einer Serie von 10 Messungen, die unter Wiederholbedingungen mit einem Ausplattierungsverfahren gewonnen wurden, werden vorausgesetzt.

Tabelle 4 – Tabellarisierung der Zählungen in 3 Experimenten zur Wiederholpräzision

Probe	Wiederholte Messungen (Ausplattierung)									
1	63	65	77	59	69	61	55	65	33	90
2	47	60	40	57	24	39	57	52	35	54
3	21	16	20	24	21	34	23	26	18	14

ANMERKUNG Die Formeln für die folgenden Berechnungen sind in Anhang D, Formeln (D.1) und (D.2) angegeben.

6.4.2.2 Ausgearbeitetes Beispiel: Die Bestimmung der Überdispersion durch Anwendung des Poisson-Indexes

Für Probe 1 der beobachtete Wert von $\chi^2_{r-1} = [10 \times (63^2 + 65^2 + 77^2 + \dots + 33^2 + 90^2) / (63 + 65 + 77 + \dots + 33 + 90)] - (63 + 65 + 77 + \dots + 33 + 90) = 30,582\ 4$.

Für die erste Reihe:

Arithmetischer Mittelwert($\bar{x}$) = 63,7

Varianz (S^2) = 216,455 6

Relative operative Varianz (u_0^2) = (216,455 6 – 63,7) / 63,7² = 0,037 6.

In Tabelle 5 werden die berechneten Werte für die relative operative Varianz für die drei analysierten Proben dargestellt.

Tabelle 5 – Berechnung der relativen operativen Varianz

Probe	Arithmetischer Mittelwert	Varianz	Beobachteter Wert der χ^2_{r-1}	Relativen operativen Varianz u_0^2
1	63,7	216,455 6	30,582 4	0,037 6
2	46,5	136,277 8	26,376 3	0,041 5
3	21,7	31,788 9	13,184 3	0,021 4

Gemäß χ^2 -Verteilung ist der kritische Wahrscheinlichkeitswert 0,95 für (10-1) der Freiheitsgrade: 16,919 0.

Der beobachtete Wert χ^2_{r-1} übertrifft den kritischen Wahrscheinlichkeitswert 0,95 für die Proben 1 und 2, daher wird eine bedeutende Überdispersion in den Reihen der wiederholten Messungen nachgewiesen. Die relative operative Varianz u_0^2 gibt eine Größenordnung der operativen Veränderlichkeit für jede Serie der wiederholten Messungen an.

Für Probe 3 ist der beobachtete Wert von χ^2_{r-1} niedriger als der kritische Wahrscheinlichkeitswert von 0,95. Die beobachtete Veränderlichkeit zwischen parallelen Zählungen erfüllt die Poisson-Verteilung. Selbst wenn es statistisch gesehen nicht von Bedeutung sein sollte, kann die berechnete relative operative Varianz für Probe 3 für weitere globale Auswertungen aufbehalten werden.

Die durchschnittliche relative operative Varianz für Probe 3 ist gleich 0,033 5. Die endgültige Formulierung der Wiederholpräzision in % ist die Quadratwurzel aus der durchschnittlichen relativen operativen Varianz (18,3 %). Es geht einher mit der Leistung des Verfahrens hinsichtlich des Prüfmaterials unter Wiederholbedingungen.

6.4.3 Laborinterne Vergleichpräzision

Laborinterne Vergleichpräzision ist auch als Vergleichspräzision unter Zwischenbedingungen (oder Präzision unter Zwischenbedingungen) bekannt. Diese wird bei Gewinnung von Replikatsätzen unter möglichst unterschiedlichen Bedingungen innerhalb eines Labors ausgewertet (z. B. verschiedene Techniker, verschiedene Inkubatoren und verschiedene Medienchargen ...).

Die experimentelle Gestaltung wird in ISO 29201 [21] beschrieben. Das gesamte analytische Verfahren wird bei Verwendung der maximalen Veränderung der Laborparameter dupliziert. Natürliche Proben müssen soweit möglich untersucht werden. Eine Mindestanzahl von 30 Proben wird empfohlen.

6.4.3.1 Ausgearbeitetes Beispiel für Koloniezählungen

10 Proben, die in zwei Replikaten x_1 und x_2 unter möglichst unterschiedlichen Bedingungen innerhalb des Labors ausgeführt werden (erweiterte Vergleichsbedingungen innerhalb eines Labors) werden vorausgesetzt:

Tabelle 6 – Tabellarisierung der Koloniezählungen für 10 Proben, die doppelt analysiert wurden

Probe	x_1	x_2	Arithmetischer Mittelwert	Varianz	Relative operative Varianz u_0^2
1	34	23	28,5	60,5	0,039 4
2	17	15	16	2	-0,054 7
3	11	27	19	128	0,301 9
4	40	21	30,5	180,5	0,161 2
5	42	25	33,5	144,5	0,098 9
6	43	38	40,5	12,5	-0,017 1
7	25	12	18,5	84,5	0,192 8
8	34	28	31	18	-0,013 5
9	58	39	48,5	180,5	0,056 1
10	37	48	42,5	60,5	0,010 0

ANMERKUNG 1 Die Formel, die für die Berechnungen in Tabelle 6 verwendet wird, wird in Anhang D , Formel (D.2) angegeben.

ANMERKUNG 2 Theoretisch kann die Varianz niemals negativ sein. Wenn jedoch ein Varianzschätzwert durch Subtraktion gewonnen wurde und die experimentellen Varianzen auf kleiner Anzahl an Replikaten basieren, können sich solche Dinge ereignen.

Die durchschnittliche relative operative Varianz für Probensätze mit 10 Zählpaaren beträgt 0,077 5. Die Quadratwurzel einer durchschnittlichen relativen operativen Varianz (27,8 %) geht einher mit der Verfahrensleistung des Prüfmaterials unter erweiterten Vergleichsbedingungen innerhalb eines Labors.

6.4.3.2 Ausgearbeitetes Beispiel für MPN-Systeme

10 Proben wurden im Duplikat mithilfe des MPN-Verfahrens analysiert. Für jede Probe wurden die zwei wiederholten Messungen unter laborinternen Bedingungen durchgeführt, um die maximale Veränderlichkeit der analytischen Bedingungen innerhalb des Labors zu berücksichtigen.

Tabelle 7 – Tabellarisierung der MPN-Ergebnisse für 10 Proben, die im Duplikat analysiert wurden

Probe	Messungenauigkeit		Untere Vertrauensgrenze	Obere Vertrauensgrenze	Untere Vertrauensgrenze	Obere Vertrauensgrenze	Überlappung der Konfidenzintervalle unter laborinternen erweiterten Vergleichsbedingungen
	MPN ₁	MPN ₂	$T_{0,1}$	$T_{1,1}$	$T_{0,2}$	$T_{1,2}$	
1	600,1	176,1	419,3	858,9	97,2	319,1	nein
2	2 086,6	1 148,4	1 560,4	2 790,4	850,7	1 550,3	nein
3	1 885,3	1 362,8	1 413,0	2 515,5	1 017,3	1 825,5	ja
4	76,8	110,0	31,9	184,9	52,5	230,6	ja
5	1 672,6	2 094,8	1 254,0	2 230,9	1 566,3	2 801,6	ja
6	799,8	311,8	576,6	1 109,5	196,4	494,9	nein
7	196,7	143,8	111,8	346,3	74,9	276,2	ja
8	1 202,0	1 316,6	892,5	1 618,7	981,6	1 765,8	ja
9	7 100,7	7 682,9	4 488,8	11 232,5	4 845,4	12 181,9	ja
10	7 682,9	3 421,3	4 845,4	12 181,9	2 450,4	4 777,0	nein

Tabelle 8 – Berechnung der relativen operativen Varianz für MPN-Ergebnisse

Probe	Laborinterne Vergleichspräzision	Intrinsische Veränderlichkeit für das erste Replikat	Intrinsische Veränderlichkeit für das zweite Replikat	Durchschnittliche intrinsische Veränderlichkeit	Relative operative Varianz
	u_R^2	u_{d1}^2	u_{d2}^2	u_d^2	u_0^2
1	0,751 6	0,033 5	0,092 0	0,062 7	0,688 9
2	0,178 3	0,022 0	0,023 4	0,022 7	0,155 6
3	0,052 7	0,021 6	0,022 2	0,021 9	0,030 7
4	0,064 5	0,200 9	0,142 5	0,171 7	-0,107 2
5	0,025 3	0,021 6	0,022 0	0,021 8	0,003 5
6	0,443 7	0,027 9	0,055 6	0,041 7	0,401 9
7	0,049 1	0,083 2	0,110 8	0,097 0	-0,047 9
8	0,004 1	0,023 1	0,022 4	0,022 8	-0,018 6
9	0,003 1	0,054 7	0,055 3	0,055 0	-0,051 9
10	0,327 2	0,055 3	0,029 0	0,042 2	0,285 1

ANMERKUNG Die Formeln, die für die Berechnungen in Tabelle 8 verwendet werden, sind in Anhang D, Formeln (D.4), (D.5), (D.6) und (D.7) angegeben.

Die durchschnittliche relative operative Varianz, die aus dem Satz aus 10 Paaren berechnet wurde, beträgt 0,134 0. Die Quadratwurzel (36,6 %) ist die Veränderlichkeit des Verfahrens, das unter laborinternen Vergleichsbedingungen beobachtet wurde.

6.5 Robustheit

6.5.1 Allgemeines

Robustheit bedeutet die Toleranz zu leichten Veränderungen in Verfahren oder gegenüber unvermeidbaren Varianz unter Laborbedingungen.

Die Bestimmung der Robustheit verändert sich entsprechend der Verfahrensweise, die untersucht wird. Spezifische Studien dazu werden erforderlich.

Zweck solcher Studien ist, die Grenzen innerhalb eines Verfahrens zu spezifizieren, wobei ein Verfahren als passend für den bestimmungsgemäßen Gebrauch sein soll. Die Betrachtung der Robustheit kann zu Einschränkungen führen, die den Anwendungsbereich und die Bedingungen des Verfahrensgebrauchs berücksichtigen.

6.5.2 Experimentelle Gestaltungen für Auswirkungen aufgrund von Zeit und Temperatur

Für die meisten mikrobiologischen Verfahren sind Zeit und Temperatur der Inkubation von Bedeutung.

Für kommerziell vorbereitete Prüfvorrichtungen kann auch die Lagerbeständigkeit des Produkts ein wichtiger Parameter sein.

Bei der Studie der Robustheit eines Verfahrens sollten Duplikatsproben entweder von gesäten oder natürlich kontaminierten Proben bis zum Extrem des untersuchten Parameters gehen. Einige Plattierungen können wiederholt ausgelesen werden, wobei die Platten für weitere Bebrütung im Brutschrank nach jedem Auslesen zurückgegeben werden.

Falls eine Verfahrensweise beispielsweise den Temperaturbereich $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$ angibt, sollten die Proben bei $34 ^\circ\text{C}$ und $36 ^\circ\text{C}$ bebrütet werden. Falls die Brutzeitspanne 18 h bis 22 h beträgt, sollten die Proben zwischen 18 h und 22 h ausgelesen werden. Es kann vorzugsweise Daten zur Robustheit als Matrix (zum Beispiel) produzieren, mithilfe der maximalen und minimalen Inkubationstemperaturen für die maximale und minimale Dauer der Bebrütung.

Ein weiterer Plan ist, dass eine Serie von parallelen Plattierungen vorbereitet wird, dann werden diese in verschiedenen Teilen des Inkubators gestellt und nach verschiedenen Zeitperioden aus dem Inkubator genommen. Die zweite Gestaltung misst auch die Inkubationsflächenauswirkungen (siehe ISO 29201 [21]). Sollte der Entwickler eines Verfahrens die Anwendbarkeit des Verfahrens zu einer zu berücksichtigenden Temperaturspanne beanspruchen, sind spezielle Experimente mit mehreren Inkubatoren bei verschiedenen Temperaturen erforderlich.

Eine Mindestanzahl von 30 Datenpunkten sollte für jeden Parameter gesammelt werden.

Daten sollten mithilfe eines Minimums an drei Quellen von Zielorganismen gesammelt werden, um zu entscheiden, ob diese Referenzkulturen oder im Labor vorbereitetes dotiertes Material ist.

Graphische Verfahren und normierte statistische Prüfungen wie Schlussfolgerungen aus parametrischen oder nicht parametrischen Prüfungen können für die Datenanalyse verwendet werden, um zu entscheiden, ob diese durch direkte mikroskopische Zählungen, durch MPN-Verfahren oder Koloniezählungen errechnet werden.

6.6 Relative Wiederfindung

6.6.1 Allgemeines

Die Richtigkeit bezieht sich auf die Nähe der beobachteten Ergebnisse zum wahren Wert, die absolute Richtigkeit eines mikrobiologischen Prüfergebnisses kann jedoch nicht bestätigt werden.

Das Beste ist, dass man einem einheitlichen wahren Wert zustimmt. Dies kann das Ergebnis, das von einem weiteren Verfahren bestimmt wurde, der Mittelwert eines zertifizierten Referenzmaterials, das durch den Produzenten vorgegeben wurde, oder der Mittelwert von Beobachtungen in verschiedenen Laboratorien in der Qualitätssicherung sein.

Die Wiederfindung, verglichen mit der akzeptierten Referenz, auch als relative Wiederfindung bezeichnet, ist das Beste für die quantitative Bestimmung der systematischen Abweichung (Abweichung vom wahren Wert).

Wenn Membranfilter ein Bestandteil des Verfahrens sind, müssen sie im Wiederfindungsvergleich verwendet werden. Membranfilter jedoch können selbst einen Teil der systematischen Abweichung erzeugen und folglich die relative Wiederfindung beeinflussen. Für Informationen zu Wiederfindungsvergleiche siehe ISO 11133 und ISO 7704. Des Weiteren ist die Interaktion zwischen Membranfiltern und Nährmedien von Interesse und kann erheblich zur systematischen Abweichung hinzugefügt werden.

6.6.2 Bestimmung der relativen Wiederfindung

Wahre Wiederfindung durch ein Verfahren kann mit Prüfungen mit Reinkulturen oder dotierten sterilisierten Proben erreicht werden, unter Verwendung eines nicht-selektiven Verfahrens als Referenz (siehe ISO 11133). Zertifizierte Referenzmaterialien sind für diesen Zweck ebenfalls verfügbar. Diese Annäherungen jedoch hängen von der Wiederfindungseffizienz des Verfahrens ab, das beim Prüfen des Referenzmaterials oder bei der Bestimmung des Referenzwerts verwendet wird.

Der Wirkungsgrad der Wiederfindung verschiedener mikrobiologischer Verfahren variiert im Wesentlichen und kann ebenso durch Matrixauswirkungen bedeutend zu Beeinträchtigungen führen. Deshalb ist es vernünftig, die relative Wiederfindung von Verfahren mit den verschiedenen geprüften Matrizen festzulegen.

Für die Bestimmung der relativen Wiederfindung können natürlich kontaminierte Proben, dotierte Proben oder Reinkulturen verwendet werden. Bei Trinkwasserverfahren, bei denen die Proben für derartige Studien ausgewählt werden, sollte die Menge der Zielorganismen, die zur dotierten Probe hinzugefügt wurde, die Menge überschreiten, die normalerweise um mehr als eine Größenordnung natürlich vorkommen. Bei anderen Matrizen, wie Erholungsgewässer, Klärschlämme und Abwässer, ist die Anzahl der üblicherweise gefundenen Zielorganismen oft angemessen, aber solche Proben können eine Verdünnung erfordern.

Eine Mindestanzahl an drei verschiedenen Organismen sollte für die Dotierungsexperimente verwendet und eine Mindestanzahl an 30 Datenpunkten sollte gesammelt werden.

Eine relative Wiederfindung sollte dann untersucht werden, damit es möglichst realistisch wird, indem eher natürlich kontaminierte Proben als künstliche Prüfmaterialien verwendet werden. Alternativ dazu können dotierte Proben mit natürlich kontaminierten Materialien verwendet werden.

Um subjektiv wertfrei zu sein, muss der Vergleich auf bestätigten Koloniezählungen beruhen, bei dem auch alle Kolonien bestätigt wurden.

Das Verfahren, das in ISO 17994 beschrieben wird, wird für die Bestimmung der Verfahrensdurchführung zur relativen Wiederfindung empfohlen (beide Koloniezählungen und MPN).

6.7 Zählunsicherheit

6.7.1 Allgemeines

Die grundlegende Zuverlässigkeit der Zählungen wird durch wiederholtes Zählen der Kolonien derselben Platten innerhalb einer kurzen Zeit untersucht. Die Beobachtungen zu Zählunsicherheit geben einen ersten Eindruck der möglichen Probleme bei der verbreiteten Anwendung des Verfahrens.

Gemäß ISO 29201 [21], muss Wiederhol- und laborinterne Vergleichpräzision der Zählung ausgewertet werden, d. h. der individuelle oder gemeinsame numerische Schätzwert der Zählunsicherheit, der als relative Standardabweichung ausgedrückt wird.

Die Zählunsicherheit dient als Grundlagenwert, um andere Faktoren der Robustheit, wie die Zeitempfindlichkeit, zu schätzen.

Bei MPN-basierten Verfahren kann die laborinterne Unsicherheit des Auslesens auch durch verschiedene Operatoren gemäß ISO 29201 untersucht werden. Die Ergebnisse des MPN-Systems können von verschiedenen Operatoren ausgelesen werden. Die Messunsicherheitsberechnungen werden mit Hilfe der MPN-Werte, die jeder Operator erhält, durchgeführt.

6.7.2 Experimentelle Gestaltung für die Auswertung der Unsicherheit beim Auszählen der Kolonien

- Die gleichen Platten werden wiederholt unter gleichartigen Bedingungen ausgelesen, d. h. innerhalb eines Zeitraums, der deutlich kürzer ist als die für dieses Verfahren angenommene zulässige Toleranz. In der Praxis bedeutet dies einen maximalen Zeitraum von einer Stunde.
- Die Platten für wiederholte Zählungen sollten nach dem Zufallsprinzip, unter Auslassung von Platten mit weniger als 20 Kolonien, ausgewählt werden, wobei die ungewöhnlichen nicht ausgewählt werden. Ansonsten sollten die beprobten Platten den gesamten Anwendungsbereich des Verfahrens repräsentieren.
- Für eine verlässliche, allgemeine Schätzung sollten mindestens 30 Platten zur Verfügung stehen.

6.7.3 Beispiel einer individuellen (oder personellen) Unsicherheit beim Auszählen der Kolonien

Ein Techniker, der mit dem mikrobiologischen Verfahren vertraut ist, sollte verschiedene Platten innerhalb eines kurzen Zeitraums zweimal auslesen (z. B. In weniger als einer Stunde). Die Duplikate der Zählungen werden als x_1 und x_2 bezeichnet.

Tabelle 9 — 'Unsicherheit beim Auszählen der Kolonien

Platte	x_1	x_2	$x_1 - x_2$	$x_1 + x_2$	$u_{\text{rel,L}}^2$
1	129	122	7	251	0,001 556
2	417	377	40	794	0,005 076
3	73	80	-7	153	0,004 186
4	49	52	-3	101	0,001 765
5	86	81	5	167	0,001 793
6	37	39	-2	76	0,001 385
7	112	115	-3	227	0,000 349
8	204	214	-10	418	0,001 145
9	66	71	-5	137	0,002 664
10	306	299	7	605	0,000 268
Summe	1 479	1 450			0,020 186

ANMERKUNG Die Formel, die für die Berechnungen in Tabelle 9 verwendet wird, wird in Anhang E, Formel (E2) angegeben.

Der durchschnittliche Schätzwert der relativen operativen Varianz der Zählung ist der Durchschnittswert von $u_{\text{rel,L}}^2 = 0,020\,186/10 = 0,002\,0186$. Die Quadratwurzel von 0,044 9 wird folglich als eine 4,5 %ige relative Standardmessunsicherheit der Wiederholpräzision bei der Zählung durch diese Person angegeben.

In diesem Beispiel mit realen Werten aus Gesamtkoloniezählungen auf nicht-selektiven Medien war die relative Standardabweichung unter Wiederholbedingungen meist größer als der oben angegebene „Idealwert“ ($u_{\text{rel,L}} < 0,02$), bleibt jedoch unter der Grenze von 0,1.

Wenn der Wert hoch ist (größer als 0,1) kann es angebracht sein, zur Tabelle zurückzugehen, um die individuellen $u_{\text{rel,L}}$ -Werte auf Ursachen hin zu untersuchen. Es könnte ein zufällig hoher Wert verantwortlich sein oder es könnte ein Trend in den mittleren Koloniezählungen vorhanden sein. Dies wird am besten graphisch dargestellt, indem die $u_{\text{rel,L}}$ -Werte gegen die Koloniezählungen aufgetragen werden.

6.7.4 Beispiel einer laborinternen Unsicherheit beim Auszählen der Kolonien

Fünf Techniker nahmen an der Koloniezählung teil. Standardagarplatten wurden aus vorhandenen Bestimmungen ausgewählt und von jedem Teilnehmer ausgelesen. Platten mit weniger als 20 Kolonien wurden nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse von sechs Platten sind in Tabelle 10 angegeben.

ANMERKUNG Sechs Platten sind bei weitem zu wenig für eine zuverlässige allgemeine Schätzung, verdeutlichen jedoch die Berechnungen.

Der Erwartungswert (m) und die Standardabweichung (s) jeder Platte werden zuerst berechnet. Aus diesen werden die Werte von $u_{\text{rel,L}} = s/m$ erhalten (vorletzte Spalte).

Tabelle 10 — Laborinterne Unsicherheit beim Auszählen der Kolonien

Platte	A1	A2	B1	B2	B3	<i>m</i>	<i>s</i>	$u_{\text{rel,L}}$	$u_{\text{rel,L}}^2$
1	33	26	33	34	33	31,8	3,271 085	0,102 864	0,010 581
2	160	156	166	176	174	166,4	8,648 699	0,051 975	0,002 701
3	142	128	142	146	139	139,4	6,841 053	0,049 075	0,002 408
4	78	97	81	81	83	84,0	7,483 315	0,089 087	0,007 937
5	89	94	81	94	92	90,0	5,431 390	0,060 349	0,003 642
6	38	44	38	42	40	40,4	2,607 681	0,064 547	0,004 166
Summe	540	545	541	573	561				0,031 436

ANMERKUNG Die Formel, die für die Berechnungen in Tabelle 10 verwendet wird, wird in Anhang E, Formel (E.1) und (E.3) angegeben.

Die Summe von $u_{\text{rel,Li}}^2$ (Summe der relativen Varianz) ist 0,031 436 und ihr Durchschnitt 0,005 239 3. Ihre Quadratwurzel von 0,0724 ist der Durchschnitt der relativen laborinternen Zählunsicherheit bei diesem Verfahren und der Gruppe der Operatoren (7,2 %).

6.7.5 Beispiel einer laborinternen Unsicherheit beim Auszählen von MPN

Die Ergebnisse von 30 verschiedenen Proben wurden von zwei verschiedenen Operatoren ausgelesen. Die Ergebnisse von den ersten fünf Platten werden in Tabelle 11 unten dargestellt:

Tabelle 11 — Laborinterne Unsicherheit beim Auszählen von MPN

Probe	Analytiker 1	Analytiker 2	Relative Varianz
1	1 409,3	1 273,8	0,005 1
2	3 074,5	2 905,3	0,001 6
3	4 984,2	5 363,5	0,002 7
4	1 114,0	1 047,1	0,001 9
5	651,1	778,3	0,015 9
		Mittelwert	0,005 4

ANMERKUNG Die Formel, die für die Berechnungen der relativen Varianz in Tabelle 11 angegeben wird, wird in Anhang E, Formel (E.1) in einer quadratischen Form verwendet.

Die Quadratwurzel der durchschnittlichen relativen Varianz ist der Durchschnittswert der relativen Zählunsicherheit bei MPN durch verschiedene Operatoren. Im numerischen Beispiel ist ihr Wert 0,073 5 (7,3 %).

7 Gestaltungen für die Verifizierung eines Verfahrens durch ein einzelnes Labor

7.1 Allgemeine Überlegungen

Dieser Abschnitt beschreibt die Verfahren zur Prüfung, dass das Verfahren in einem angegebenen Labor angemessen durchgeführt wurde. Die Merkmalsuntersuchungen sind nicht so breit gefächert wie für die ursprüngliche Bestimmung der Leistungsmerkmale, daher ist die Anzahl der erforderlichen Datenpunkte allgemein niedriger.

7.2 Berechnung der Sensitivität, Spezifität, Effizienz, Selektivität, Falsch-Positiv-Rate und Falsch-Negativ-Raten

7.2.1 Verwendeter Probentyp

Proben werden vorbereitet, die 20 bis 80 Zielorganismen je untersuchte Volumen enthalten. Natürlich kontaminierte Materialien werden möglichst für die Vorbereitung der Proben bevorzugt. Bei Bakterien als Fäkalindikator können mit Abwasser verschmutztes Oberflächenwasser oder Abwasser verwendet werden. Die Proben werden dann durch das durchdachte Verfahren untersucht. Typische und atypische Kolonien (d. h. welche, die ein typisches Erscheinungsbild des Zielorganismus aufweisen und welche, die kein typisches Erscheinungsbild des Zielorganismus aufweisen) werden gezählt. Beide typischen und atypischen Kolonien werden identifiziert mithilfe eines geeigneten Verfahrens, das kommerziell verfügbare mikrobielle Identifizierungswerkzeuge, DNA-Sequenzen oder andere spezifizierten Verfahrensweisen umfasst.

Die verwendeten Probentypen variieren mit dem durchdachten Verfahren und den Zielorganismen. Beispielsweise bei Verfahren für gesamtkeimformige Bakterien ist ein mit Oberflächenwasser dotiertes Trinkwasser oder Abwasser angemessen. In Trinkwasser werden Verdünnungen angerührt, um 20 bis 80 Zielorganismen pro 100 ml zu erhalten. Bei Membranfilterverfahren, die gesamtkeimformige Bakterien sowie *E. coli* auf der gleichen Membran nachweisen, sollte die Zielanzahl von *E. coli* 10 Kolonien oder eventuell weniger betragen, die Einheiten bilden.

7.2.2 Anzahl der Proben

Eine Mindestanzahl an fünf Proben sollte aus Trinkwasser dotiert werden. Das Oberflächenwasser oder Schmutzwasser für die Vorbereitung des dotierten Materials sollte mindestens aus zwei Quellen gewonnen werden.

7.2.3 Verfahrensweise

Die Proben werden dann bebrütet und alle Kolonien „bestätigt“ gemäß der Verfahrensweise, die zu diesem Verfahren angemessen ist. Bei Verfahren ohne Bestätigungsverfahrenswesen sollte eine angemessene Bestätigungsverfahrenswese ausgewählt werden. Kolonien werden dann aufgezeichnet als Echt- oder Falsch-Positive und Echt- oder Falsch-Negative.

7.2.4 Kategorische Leistungsmerkmale

siehe 6.2.2

7.3 Bestimmung der Wiederholpräzision

Die Gestaltung für die Bestimmung der Wiederholpräzisionsleistung eines Verfahrens besteht aus 10 Replikaten der gleichen Probe, die unter Wiederholbedingungen analysiert wurden, d. h. durch den gleichen Techniker am gleichen Tag, etwa zur gleichen Zeit und alle im Inkubator bebrüteten Proben

Eine Mindestanzahl von drei Datensätzen der Wiederholpräzision sollte unter Verwendung von Zielorganismen aus verschiedenen Quellen und Stufen vorbereitet werden. Bevorzugt werden natürlich kontaminierte Proben. Die drei Datensätze werden dann mit Hilfe des Verfahrens gesammelt und untersucht, das in 6.4.2.2 beschrieben wird.

7.4 Zählunsicherheit

7.4.1 Allgemeines

Die Zuverlässigkeit der Zählungen wird durch wiederholtes Zählen der Kolonien derselben Platten oder positiven Röhrchen/Schächte des gleichen MPN-Systems innerhalb einer kurzen Zeit untersucht. Die Beobachtungen zu Zählunsicherheit geben einen Hinweis auf mögliche Probleme bei der Anwendung des Verfahrens. Unsicherheit der Zählung kann mit einzelnen oder mehreren Analytikern bestimmt werden. Falls mehrere Analytiker die Prüfung routinemäßig durchführen, sollte die Unsicherheit der Zählung mit mehreren Analytikern durchgeführt werden (siehe 6.7).

Anhang A (informativ)

Mathematische Variationsmodelle

A.1 Allgemeines

Die zufällige Variation der Partikelzahl zwischen parallelen Anteilen einer Ermittlungsstichprobe ist beachtlich, selbst wenn die Suspension vollständig durchmischt (vollkommen zufällig) ist und keine technischen Messunsicherheiten beteiligt sind. Diese unvermeidliche intrinsische Variation ist eine Eigenschaft von Suspensionen und gilt für alle mikroskopischen und Koloniezählverfahren. Sie kann mathematisch mit Hilfe der Poisson-Verteilung modelliert werden.

Die Poisson-Verteilung macht nicht die intrinsische Variation der MPN-Zählungen aus.

A.2 Grundsätzliche Ungenauigkeit von Koloniezählungen

Die Varianz der Poisson-Verteilung ist gleich dem Wert des arithmetischen Mittels. Gleichheit des Mittelwertes und der Varianz ist kein Beweis, dass die Daten die Poisson-Verteilung befolgen. Die Kompatibilität wird herkömmlich mit Hilfe des Poisson-Indexes der Dispersion χ^2_{r-1} oder der damit verbundenen Statistik des Log-Likelihood-Quotienten G^2 (siehe auch Anhänge C und D).

Die relative Varianz der Poisson-Verteilung steht in einer umgekehrten Relation zur Durchschnittszählung, oder allgemeiner gesagt, Gesamtzählung der Kolonien im Detektor. Dies bedeutet, dass bei Koloniezählverfahren die Präzision kein konstantes Leistungsmerkmal ist. Die intrinsische relative Unsicherheit kann durch Erhöhung der Koloniezahl verringert werden.

$$u_{\text{rel}} = \frac{s}{x} = \frac{\sqrt{x}}{x} = \sqrt{\frac{1}{x}} = \frac{1}{\sqrt{x}} \quad u_{\text{rel}}^2 = \frac{s^2}{x^2} = \frac{x}{x^2} = \frac{1}{x} \quad (\text{A.1})$$

wobei

u_{rel} die relative Standardabweichung ist;

s Standardabweichung ist;

x die Anzahl der beobachteten Kolonien ist.

BEISPIEL 1 Eine einzelne Plattenzählung einer vollständig gemischten Suspensionsprobe, etwa 48 Kolonien, hat eine theoretische relative Präzision von $u_{\text{rel}} = 1/\sqrt{48} = \pm 0,14$ (14 %).

Die Abhängigkeit der relativen Präzision (u_{rel} , relative Standardabweichung) für die Partikelzählung ist in Bild A.1 dargestellt. Die zufallsbedingte relative Unsicherheit steigt steil an, wenn die Anzahl der unter zwanzig sinkt.

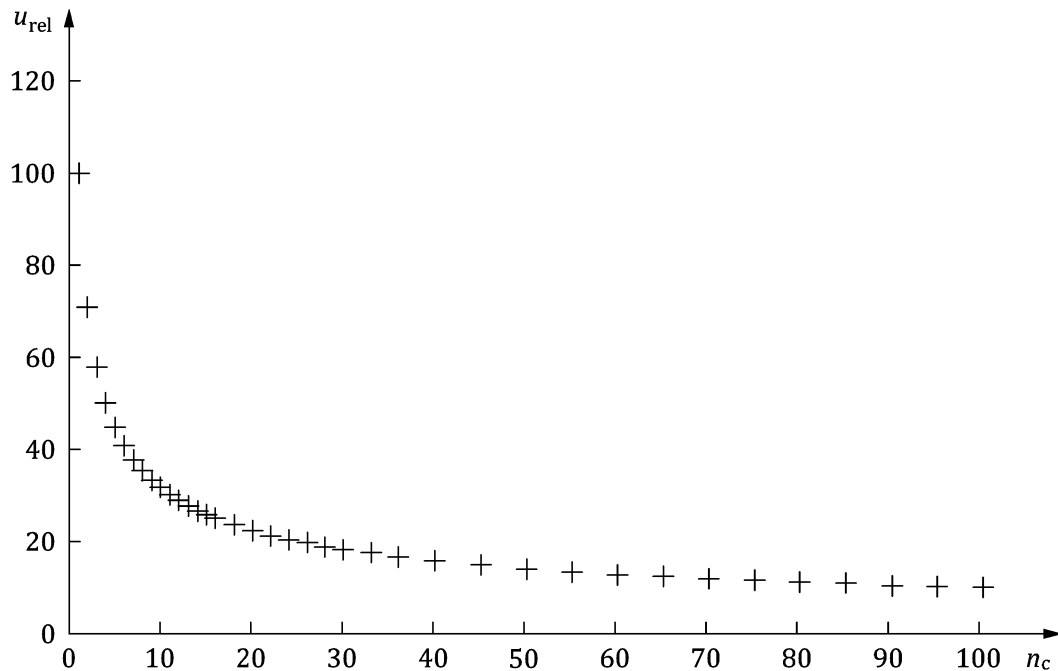


Bild A.1 — Die relative Standardabweichung (angegeben in %) der Koloniezahl in einer vollständig durchmischten Suspension, die dem Gesetz der Poisson-Verteilung folgt

Das Diagramm zeigt, warum Koloniezahlen von etwa 20, 25 oder 30 üblicherweise als niedrigste statistisch zuverlässige Zählwerte betrachtet werden. Im Zählbereich unter zehn, der von erheblichem Interesse gerade für die Volksgesundheit ist, sind einzelne Messungen derart ungenau, dass sie nur mit Mühe als etwas besser als halb quantitativ beschrieben werden können. Die relative Präzision kann jedoch durch wiederholte Messungen verbessert werden.

BEISPIEL 2 Fünf Parallelplatten wurden durch Ausplattierung in 1 ml Probenvolumina in der gleichen Laborprobe angefertigt. Die gezählte Koloniezahl war: 6, 7, 11, 6, 9.

Summe der Zählungen: $6+7+11+6+9 = 39$

Mittelwert der Zählungen: $39/5 = 8$

Theoretische relative Präzision von $u_{rel} = 1/\sqrt{39} = \pm 0,16$ (16 %).

Die theoretische relative Standardabweichung von 8 Kolonien würden $u_{rel} = 1/\sqrt{8} = \pm 0,35$ (35 %) betragen.

Das Poisson-Modell kann zur Bestimmung der niedrigsten theoretischen statistischen Unsicherheit für jede Koloniezahl verwendet werden und umgekehrt zur Bestimmung des untersten Zählwertes, um eine vereinbarte statistische Präzision zu erreichen (siehe auch Anhang B).

A.3 Die intrinsische Präzision der MPN-Zählungen

A.3.1 Allgemeines

Die relative Präzision der MPN-Verfahren hängt, zusätzlich zur Zählung selbst, von der Auswahl der Anzahl paralleler Röhrchen ab. Die Poisson-Verteilung wird in jeder Suspension angenommen, aber die Wahrscheinlichkeit des Auftretens und Nichtauftretens von positiven Reaktionen kommt zur intrinsischen Veränderlichkeit hinzu.

A.3.2 Einzelne MPN-Verdünnung

Die relative Präzision einer einzelnen Verdünnungsreihe von n_t -Röhrchen als Standardabweichung in Bezug auf der Standardabweichung in der natürlichen logarithmischen Skala wird durch Formel (A.2) ausgedrückt:

$$u(\ln M) = \frac{(1 - e^{-x})}{\sqrt{x n_p e^{-x}}} \quad (\text{A.2})$$

Das x in der Formel ist die wahrscheinlichste Anzahl an Organismen je Röhrchen, die durch die Formel (A.3) geschätzt wird:

$$x = \ln \left(\frac{n_t}{n_t - n_p} \right) \quad (\text{A.3})$$

wobei

- M der MPN-Wert ist;
- x der Mittelwert der Organismen pro Röhrchen ist;
- n_t die Anzahl der Röhrchen ist;
- n_p die Anzahl der positiven Röhrchen ist.

ANMERKUNG Die Formeln (A.2) und (A.3) können kombiniert werden, wobei sich eine Formel ergibt, bei der eine relative Präzision durch die Gesamtzahl der Röhrchen und die Anzahl der positiven Röhrchen vollständig definiert wird.

$$u_{\text{rel}}(M) \approx SD \ln(M) = \frac{1}{\ln \left(\frac{n_t}{n_t - n_p} \right)} \cdot \sqrt{\frac{n_p}{n_t(n_t - n_p)}}$$

Die Art und Weise, wie die relative (logarithmische) Präzision der MPN-Schätzwerte mit der Anzahl der positiven Röhrchen variiert, wird in Bild A.2 dargestellt.

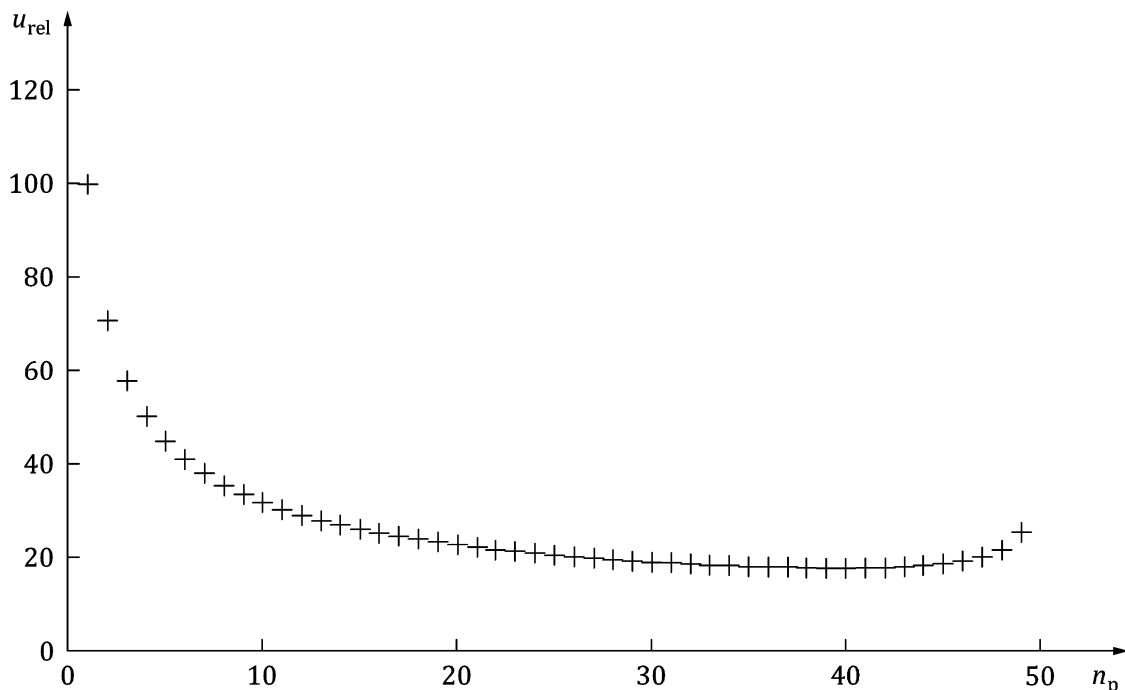


Bild A.2 — Die relative Standardabweichung (angegeben in %) der MPN-Einzelverdünnungsanalyse mit 50 parallelen Röhrchen

Bild A.2 zeigt, dass die relative Präzision der MPN-Schätzwerte eine Mindestgröße hat, wenn 80 % der Röhrchen positiv sind. Nach den Formeln (A.2) und (A.3) ist daher die bestmöglich erreichbare Präzision (kleinste relative Standardabweichung) eine Funktion der Anzahl an parallelen Röhrchen gemäß Formel (A.4):

$$u_{\min}(\ln M) = \frac{1,24}{\sqrt{n_t}} \quad (\text{A.4})$$

Die Unsicherheit eines MPN-Schätzwertes kann nicht kleiner als dieser werden. Wenn der Anteil an positiven um 80 % abweicht, wird die relative Standardmessunsicherheit größer, aber wie Bild A.2 zeigt, gibt es einen relativ langen nahezu flachen positiven Anteil der Präzisionskurve von 60 % bis 95 %.

A.3.3 Mehrfache MPN-Verdünnung

A.3.3.1 „Exakte“ Präzision

Mit MPN-Zählwerten bei mehrfachen Verdünnungen ist die relative Präzision eine geschwungene Kurve. Sie besitzt so viele lokale Minima wie Verdünnungsstufen im Nachweissystem vorhanden sind.

Als Beispiel wurde die relative Standardabweichung für ein 3×10 -Röhrchen-MPN-Nachweissystem berechnet. Die Minima treten auf, wenn die ersten, zweiten und dritten Reihen der parallelen Röhrchen abwechselnd 80 % voll von positiven sind.

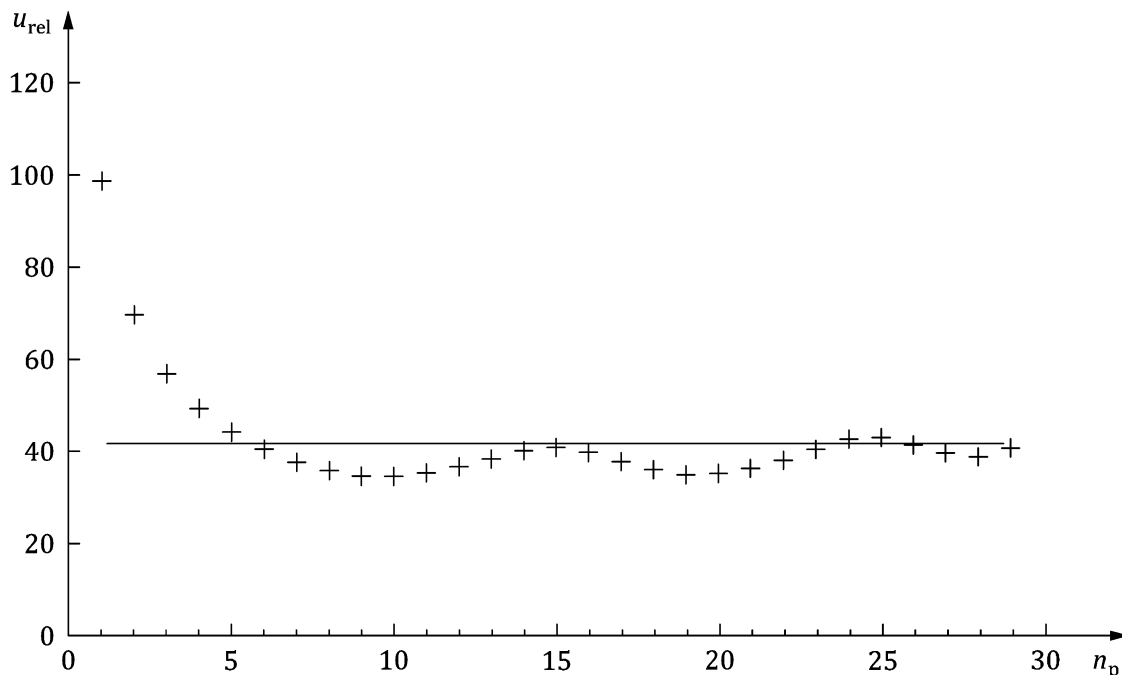


Bild A.3 — Die relative Standardabweichung (angegeben in %) eines 3×10 -MPN-Röhrchens

Die horizontale Achse repräsentiert die Anzahl an positiven Röhrchen im ganzen Satz. Die Wellenlinie gibt die berechnete relative Standardabweichung wieder.

Die relative Präzision einer mehrfachen MPN-Verdünnung hängt hauptsächlich von der Anzahl an parallelen Röhrchen pro Verdünnung ab. Mehrfache Verdünnungen sind jedoch nicht vollständig ohne Auswirkungen. Als Beispiel zeigt Bild A.3, dass die niedrigsten Minima (das erste) für die 3×10 MPN-Systeme den Wert 0,349 6 (35 %) hat, wohingegen die minimale relative Standardabweichung für eine Zehn-Röhrchen MPN-Einzelverdünnung gemäß Formel (A.4) 0,392 1 (39 %) ist.

A.3.3.2 Angenäherte Merkmalspräzision

Cochran ([9]) schlug eine angenäherte konstante Standardabweichung für den gesamten MPN-Bereich vor. Gemäß der Gleichung nach Cochran hängt die Präzision der MPN-Bestimmung im logarithmischen Maßstab in einfacher Weise von der Anzahl der Röhrchen (n_t) und dem Verdünnungsfaktor (f) aufeinanderfolgender Verdünnungen ab.

$$SD \lg(MPN) = 0,58 \sqrt{\frac{\lg f}{n_t}} \quad (A.5)$$

Die Konstante 0,58 wurde „visuell“ für zehnfache Verdünnungen ausgewählt. Wenn der Verdünnungsfaktor zwischen den Verdünnungen weniger als zehn beträgt, kann die Konstante 0,55 verwendet werden.

Die Näherung von Cochran ist durch die horizontale Linie in Bild A.3 angegeben. Daraus wird ersichtlich, dass das genaue Ergebnis am meisten von der Näherung abweicht, wenn die meisten Röhrchen im Satz negativ sind.

Die Standardabweichung jedes einzelnen MPN-Wertes ist heutzutage einfach über ein entsprechendes Computerprogramm zu erhalten, siehe z. B. [14].

Ungeachtet des Näherungscharakters ist die Cochrans Formel bei experimentellen Planungen und Verfahrensvergleichen (siehe Beispiel unten) anwendbar. Sie vermittelt eine Vorstellung von der Merkmalspräzision eines MPN-Systems.

BEISPIEL Angenommen wird eine Bestimmung, die auf dem MPN-Nachweissystem mit 3×32 Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen beruht. Weiterhin wird ein Verdünnungsfaktor $f=3$ zwischen aufeinanderfolgenden Verdünnungen angenommen. Die Standardabweichung von $\lg MPN$, nach Cochrans Approximationsformel, beträgt:

$$SD \lg(MPN) = 0,55 \sqrt{\frac{\lg 3}{32}} = 0,55 \sqrt{0,0149} = 0,0672 \quad (A.6)$$

Eine Konvertierung zu einem natürlichen logarithmischen Maßstab ergibt $u \ln(MPN) = 2,303 \times 0,0672 = 0,15$, annähernd 15 % der relativen Präzision.

A.4 Überdispersion

A.4.1 Allgemeines

Im Poisson-Modell gibt es keine technischen und weitere zusätzliche angenommene Unsicherheiten des Verfahrens. Die Vorbereitung der Ausgangssuspension, die Verdünnung, die Beimpfung, die Bebrütung und die Zählung der Kolonien sind jedoch nicht völlig frei von Unsicherheiten. Jeder technische Schritt vermehrt die Gesamtvariabilität der Messung. Von Parallelbestimmungen, die den gesamten analytischen Prozess mit einbeziehen, kann nicht immer erwartet werden, dass sie der Poisson-Verteilung folgen. Überdispersion, d. h. eine Variation zwischen Parallelbestimmungen, die größer als vollständig zufallsverteilt (im Poisson'schen Sinne) ist, kann beobachtet werden. Diese zusätzliche Variation ist teilweise verfahrensabhängig.

Ein weiterer Faktor, der zu einer größeren Variation als die Poisson-Variante führt, ist die Verwendung einer Teilbestätigung. Überdispersion durch eine Teilbestätigung hängt von der Probe und Anzahl der Kolonietypen, die für die Bestätigung ausgewählt wurden, nicht vom Verfahren selbst ab. Sie wird zu einem Bestandteil der Messunsicherheit (siehe ISO 29201 [21]).

Aus diesen Gründen ist die Überdispersion der normale Zustand mikrobiologischer Bestimmungen und die Poisson-Verteilung ist eine vereinfachte Annäherung. Nichtsdestotrotz funktioniert manchmal das Poisson-Modell. Dies geschieht, wenn die Unsicherheit aufgrund der intrinsischen Variation wegen der niedrigen Zählungen sehr groß ist. Die technischen Unsicherheiten erscheinen vergleichsweise klein.

A.4.2 Das negative binomische Modell

Die üblichen Ursachen der Überdispersion, abgesehen von den Pseudofehlern, zeigen Effekte, die in etwa proportional zum Mittelwert oder eigentlich zu der tatsächlichen Koloniezahl sind. Weitere Gründe für das gleiche Modell der Überdispersion wurden an anderer Stelle dargestellt ([8], [11]). Da die grundlegende Unsicherheit infolge der zufälligen Streuung von Partikeln in Suspensionen der Poisson-Verteilung folgt, kann die Gesamtvarianz beschrieben werden als

$$s^2 = \bar{x} + u_0^2 \bar{x}^2 \quad (\text{A.7})$$

Dabei ist

$\bar{x}$ das arithmetische Mittel der ausgezählten Objekte (Partikel, Kolonien ...);

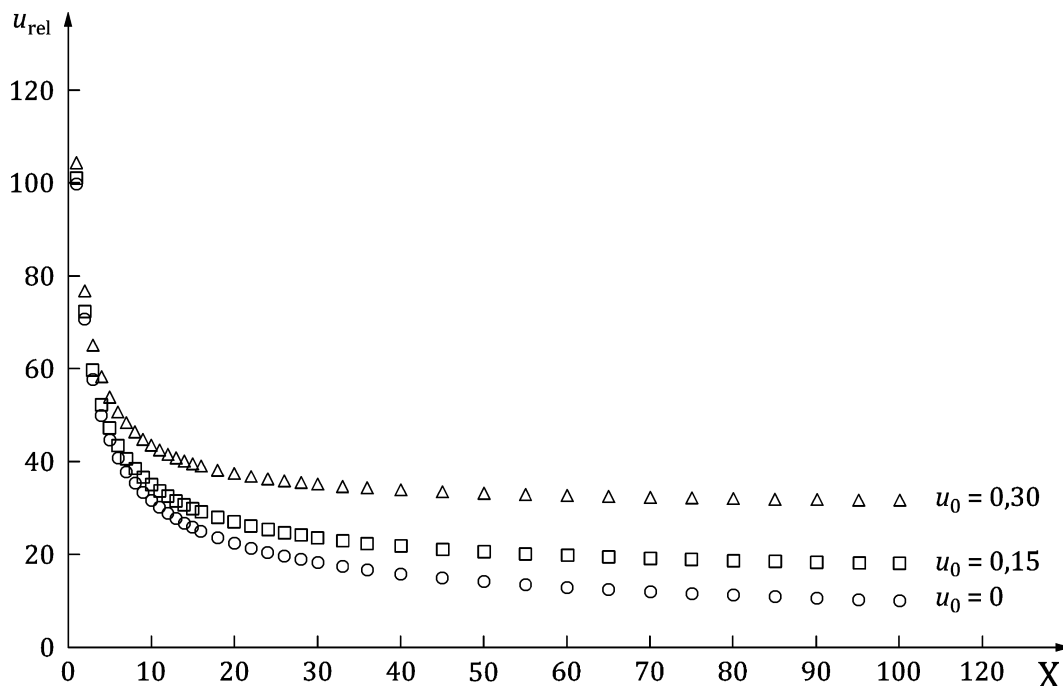
u_0 die Überdispersion, die relative operative Standardabweichung.

Der erste Teil der Varianz ist dem Poissonprozess, der Rest der kombinierten Auswirkung aller zufälligen Überdispersionsfaktoren zuzuschreiben. Eine statistische Verteilung mit diesem Varianzmodell wird als Negative Binomialverteilung (auch heterogene oder zusammengesetzte Poisson-Verteilung) bezeichnet.

Die relative Standardabweichung der Verteilung ist

$$u_{\text{rel}} = \sqrt{\frac{1}{\bar{x}} + u_0^2} \quad (\text{A.8})$$

Bild A.4 zeigt die Auswirkungen unterschiedlicher Grade an Überdispersion auf die relative Gesamtpräzision (relative Standardabweichung).



Legende

X der Mittelwert der Koloniezahl

Bild A.4 — Auswirkung der Überdispersion auf die relative Gesamtpräzision (relative Standardabweichung in %)

Untere Kurve: das Poisson-Modell ohne Überdispersion; obere Kurve: negativ binomial mit 15 % und 30 % Überdispersion (moderate zusätzliche Variation $u_0 = 0,15$ und $0,30$).

Die für eine angegebene relative Gesamtpräzision erforderliche Durchschnitts- (oder Mittelwert-) Koloniezahl ist in einem Zustand der Überdispersion erheblich höher als in einem vollständig zufallsverteilten (Poisson-) Fall. Nach Auflösung der Formel (A.9) kann die mittlere Koloniezahl berechnet werden mit $\bar{x}$.

BEISPIEL Um die relative Standardabweichung $u_{rel}^2 = 0,2$ bei einer Überdispersion von $u_0 = 0,15$ zu erreichen, bedarf es, nach Formel (A.9), einer Koloniezahl von $x = 1/(0,2^2 - 0,15^2) = 1/(0,04 - 0,0225) = 57$. Die gleiche Präzision wird in einem vollständig zufallsverteilten (Poisson) Zustand mit einer Koloniezahl von $x = 1/0,2^2 = 1/0,04 = 25$ erreicht.

ANMERKUNG Es ist eindeutig, dass eine Gesamtpräzision, die geringer ist als die Überdispersion, nicht mit einer einzigen Bestimmung erreicht werden kann. Das gesamte Verfahren muss wiederholt werden, falls höhere Präzision verlangt wird. Mit r parallelen Bestimmungen kann die relative Gesamtstandardabweichung annähernd geschätzt werden aus

$$\sum x = \frac{l}{u_{rel}^2 - u_0^2}$$

$\sum x$ = Anzahl der aufgezeichneten Koloniezahlen;

u_0 = Überdispersionskonstante, die relative operative Standardabweichung.

A.5 Nachweis von Überdispersion

Die Existenz einer statistisch bedeutenden Abweichung aus der Poisson-Verteilung kann durch Anwendung des Poisson-Dispersionsindex aus einer Serie von parallelen Zählungen geprüft werden.

$$\chi^2_{r-1} = \frac{r \sum n_i^2 - (\sum n_i)^2}{\sum n_i} = \frac{r \sum n_i^2}{\sum n_i} - \sum n_i \quad (\text{A.9})$$

Oder durch die damit verbundene Prüfung des Wahrscheinlichkeitsquotienten berechnet werden aus

$$G^2_{r-1} = 2 \left[\sum (n_i \ln n_i) - \left(\sum n_i \right) \ln \left(\frac{\sum n_i}{r} \right) \right] \quad (\text{A.10})$$

Dabei ist in beiden Formeln

r die Anzahl der parallelen Beobachtungen;

n_i die i 's. Beobachtung ($i = 1 \dots r$).

Beide Indizes gehen theoretisch (asymptotisch) nach der χ^2 -Verteilung, bei der statistische Schlussfolgerungen auf die Überdispersion (oder Unterdispersion) gezogen werden können.

ANMERKUNG Unterdispersion zeigt eine Übereinstimmung, die sich „zu nah“ an den parallelen Zählungen befindet. Dafür gibt es einige natürliche Gründe. Sie tritt bei großem Verbrauch der Prüfsuspension durch Probenanteile auf. Zufällig wurde auch beobachtet, dass der Techniker die Zählungen absichtlich oder unabsichtlich aufeinander zukommen lässt, wohlwissend, welche Platten zur gleichen parallelen Reihe gehört. Wenn parallele Platten blind codiert und mit anderen Platten vermischt werden, verliert sich Unterdispersion.

A.6 Quantitative Bestimmung von Überdispersion

A.6.1 Anscombes-Verfahren I

Anscombes-Verfahren I ist dann anwendbar, wenn eine beträchtliche Reihe unabhängiger Beobachtungen an einer einzigen Probe zur Verfügung steht, um darauf eine verlässliche Abschätzung der Varianz und des arithmetischen Mittels aufbauen zu können. Im Zahlenbereich für Mittelwerte und relative operative Varianz, die bei der Auswertung von Koloniezählverfahren von Interesse sind, ist das erste Verfahren nach Anscombe effizient ([8]). Sie besteht aus der Auflösung der Formel (A.12) nach u_0^2 .

$$u_0^2 = \frac{s^2 - \bar{x}}{\bar{x}^2} \quad (\text{A.11})$$

Um effizient zu sein, sollten die Beobachtungen innerhalb des optimalen Arbeitsbereiches liegen. Der Mittelwert sollte nicht unter 20 liegen. Dies trifft besonders dann zu, wenn die Abschätzung der operativen Veränderlichkeit innerhalb eines einzigen Experimentes angestrebt wird. Stehen einige Experimente zur Verfügung, werden die operativen Veränderlichkeitswerte aus niedrigen Zählungen sorgfältig geprüft werden.

A.6.2 Regressionsansatz

Immer wenn parallele Beobachtungen für die gleiche Probe verfügbar sind, können eine Abschätzung der Varianz und des arithmetischen Mittels berechnet werden. Eine Lösung, die ebenfalls auf Formel (A.7) basiert, bedient sich replizierter Daten aus einigen Proben. Der Vorteil ist, dass das arithmetische Mittel ein großes Spektrum abdeckt. Es sind Reihen von mehr als zwei Parallelen vorzuziehen. Es sollten mindestens 30 Proben untersucht werden.

Die Berechnung des Verhältnisses der Varianz zum arithmetischen Mittel (K) aus mehreren Replikatsätzen liefert eine Anzahl an $(\bar{x}, K)$ Paaren. Eine auf derartigen Daten aufgebaute Regressionsgerade liefert eine Abschätzung der relativen operativen Varianz.

Die Teilung beider Seiten der Formel (A.7) durch den Durchschnittswert der Koloniezahl ergibt eine Geradengleichung. Ihre Steigung stellt die relative operative Varianz dar.

$$K = \frac{s^2}{\bar{x}} = \frac{\bar{x} + u_0^2 \bar{x}^2}{\bar{x}} = 1 + u_0^2 \bar{x} \quad (\text{A.12})$$

Die Zufallsstreuung ist unvermeidlicherweise hoch, wenn die Abschätzung des arithmetischen Mittels und der Varianz auf einer geringen Anzahl an Parallelbestimmungen beruht. Der Vorteil dieser Vorgehensweise liegt darin, dass die Abschätzung der Überdispersion auf einer großen Auswahl unterschiedlicher Proben beruht. Nach Formel (A.13) hat die y -Achse voraussichtlich den Wert 1. Bei einer Anpassung der Regressionsfunktion wird sie möglicherweise nicht so angezeigt. Ist die y -Achse bedeutend größer als 1, dann wird eine Überdispersion auch auf Ebene des Nachweissystems angezeigt, wie z. B. In den Prüfsuspensionen.

ANMERKUNG Formel (A.12) gilt nur, wenn der Erwartungswert auf einer untransformierten Koloniezahl (oder Partikelzahl) beruht. Verdünnungsfaktoren und/oder Logarithmen werden nicht verwendet.

A.6.3 Index des Dispersions- $(\chi^2$ or G^2)Ansatz

Die Berechnung des Dispersionsindex von Parallelbestimmungen wird für die Qualitätssicherung in vielen Laboratorien routinemäßig durchgeführt. Folglich dürfen große Mengen an Präzisionsdaten, die für Überdispersionsberechnungen geeignet sind, automatisch gesammelt werden. Das dritte Schätzverfahren bedient sich solcher Daten.

Das Verhältnis zwischen dem Erwartungswert, der Varianz und dem Dispersionsindex ist

$$\chi_{n-1}^2 = \frac{s^2}{\bar{x}}(n-1) \quad (\text{A.13})$$

Das Verhältnis Varianz-zu-Erwartungswert, multipliziert mit den Freiheitsgraden, gibt den Indexwert (Poisson) der Dispersion an. Der Wert zur dazugehörigen Log-Likelihood-Quotientenstatistik $G^2_{(n-1)}$ kann berechtigterweise durch ihn ersetzt werden. Die Teilung beider Seiten der Formel (A.13) durch die Freiheitsgrade $(n-1)$ gibt das Verhältnis Varianz-zu-Erwartungswert an

$$K = \frac{\chi_{(n-1)}^2}{n-1} = \frac{s^2}{\bar{x}} \quad (\text{A.14})$$

Davon ausgehend, dass das negative binomiale Modell die wahrscheinlichste Beschreibung einer statistischen Veränderlichkeit einer Parallelbestimmung ist, kann der Wert des Verhältnisses Varianz zu Erwartungswert aus der Formel (A.12) eingefügt werden:

$$K = \frac{s^2}{\bar{x}} = 1 + u_0^2 \bar{x} \quad (\text{A.15})$$

Umformung und Lösung für die relative operative Varianz

$$u_0^2 = \frac{K-1}{\bar{x}} \quad (\text{A.16})$$

Der Mittelwert vieler Schätzungen (Beachtung des Vorzeichens) der relativen operativen Varianz aus verschiedenen Proben liefert einen Wert für eine allgemeine Überdispersionskonstante. In diesem Ansatz wird die Poisson-Verteilung der Prüfsuspension als Voraussetzung angesehen (siehe A.6.2).

A.6.4 Überdispersion auf dem Niveau des Nachweissystems

Eine klassische Beobachtung ist, dass Parallelzählungen aus einer einzigen Suspension ebenfalls stärker variieren können, als nach Poisson-Verteilung erlaubt ([13]). Auf dieser Ebene sind Pipettierfehler, Ungenauigkeiten bei der Zählung und Pseudofehler ("Unfälle") und möglicherweise auch Probeneigenschaften und Bebrütungsbedingungen die Ursachen für die Überdispersion. Ein Maßstab für die Qualitätssicherung ist die Überdispersion auf dem Niveau des Nachweissystems. In gewissem Maße hängt dies auch vom Verfahren ab. Sie kann durch Dispersionsindizes (χ^2 , G^2) aufgedeckt werden (siehe A.6.3).