



Quantitative Mikrobiologie: Grenzwerte und Messunsicherheit

Goetz Hildebrandt

**Fachbereich Veterinärmedizin
Institut für Lebensmittelhygiene**

• 1. Genauigkeit = Richtigkeit und Präzision

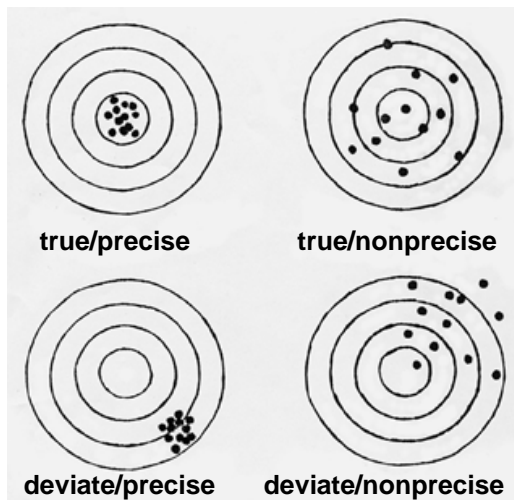
Wie bei jedem quantitativen Messergebnis wird auch die Genauigkeit (= Ausmaß der Annäherung an den wahren / richtigen Wert) des Resultats einer Koloniezählung von zwei Merkmalen bestimmt:

- **Richtigkeit** = Annäherung des mittleren Ermittlungsergebnisses (=Erwartungswert) an den wahren / richtigen Wert. Ergebnisabweichungen basieren auf **systematischen Einflüssen**.
- **Präzision** = Ausmaß der gegenseitigen Annäherung voneinander unabhängiger Ermittlungsergebnisse unter Wiederhol- oder Vergleichsbedingungen. Die Ergebnisstreuung wird durch **ungerichtete, zufällige Einflüsse oder Faktorenkomponenten** hervorgerufen.

- **Accuracy of quantitative microbiological results**



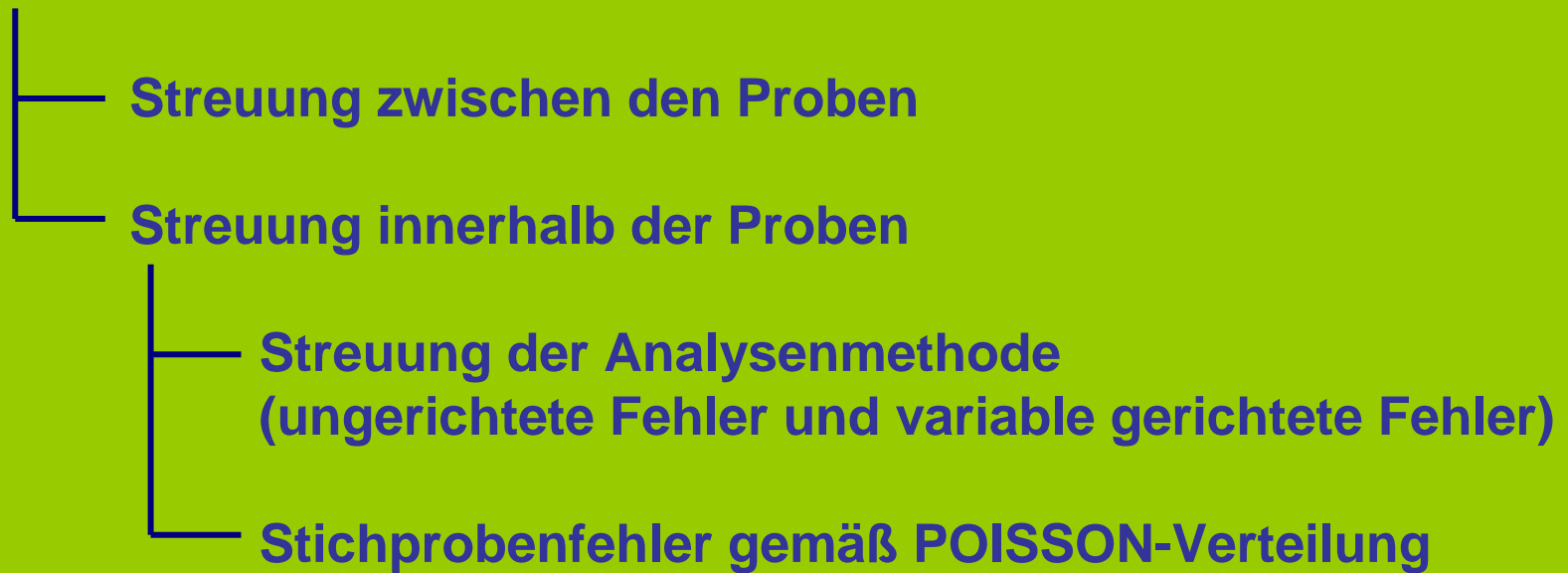
Accuracy = trueness + precision
Genauigkeit = Richtigkeit + Präzision
Justesse = justesse de la moyenne + fidélité



- **Repeatability (Wiederholbarkeit)** means precision of analytical data obtained under identical conditions
- **Reproducibility (Vergleichbarkeit)** means precision of analytical data obtained under different conditions (analyst, laboratory, apparatus)

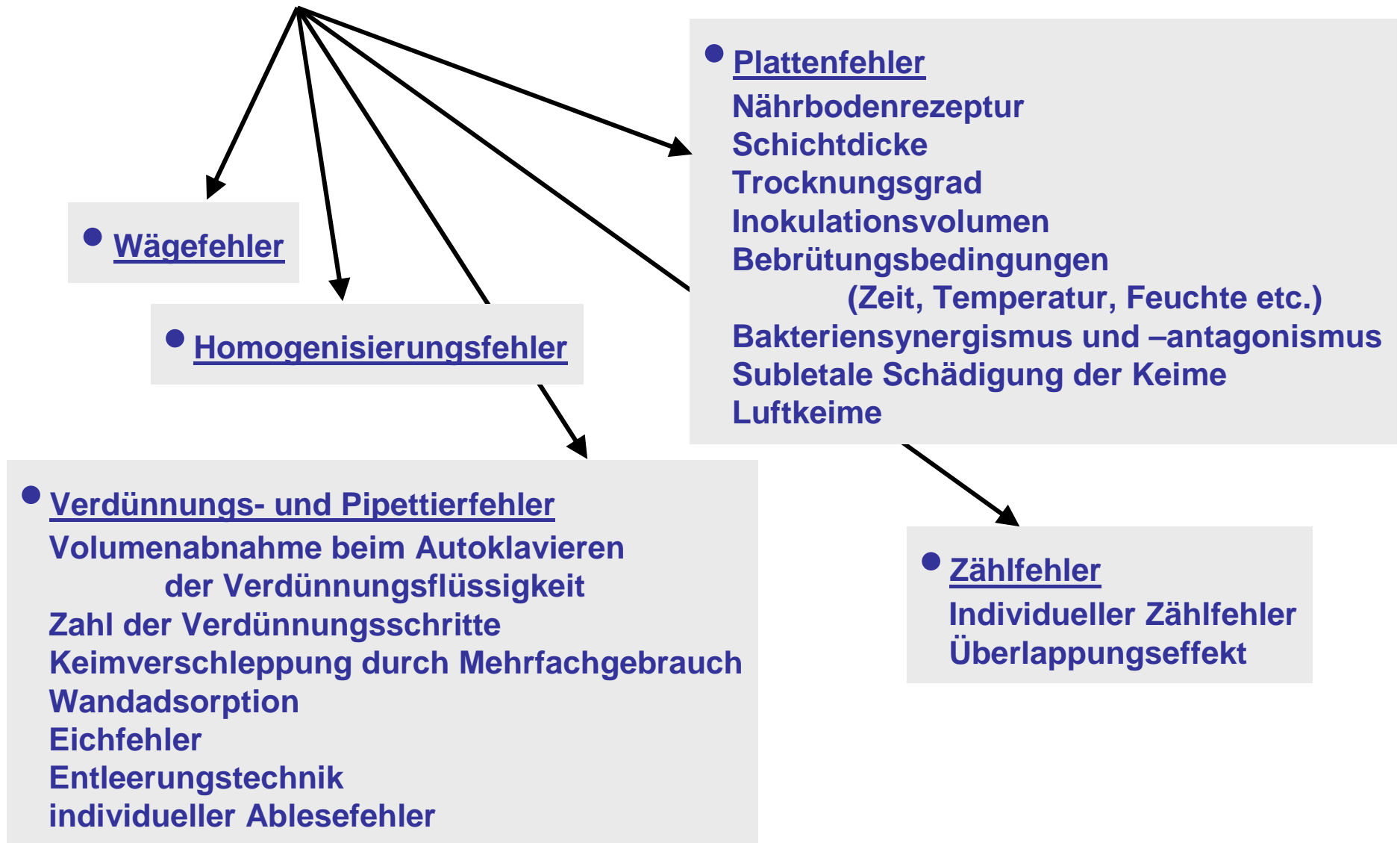
- Da der wahre Wert für die Keimzahl nicht verlässlich festgelegt werden kann, beschränken sich Angaben zur Genauigkeit in der mikrobiologischen Analytik meist auf die **Präzision**.
- Beim Rückschluss von dem an der Stich- / Messprobe gewonnenen Ergebnis auf die Beschaffenheit der Bezugsgesamtheit sind folgende ungerichteten Fehler, welche die **Gesamtstreuung** ausmacht, zu berücksichtigen:

- **Gesamtstreuung**



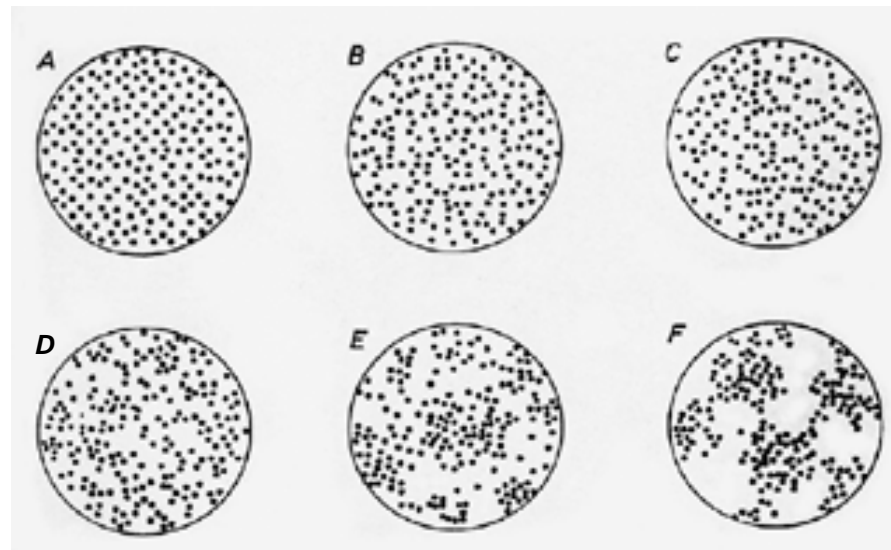
• Methodologische Fehler der Koloniezahlbestimmung

meist systematisch, aber jeweils mit merkmaltypischer Varianz (~ uncertainty)



- Precision: Random distribution**

Which picture shows a random distribution of microorganisms in a homogenized sample?



- discussion / conclusion

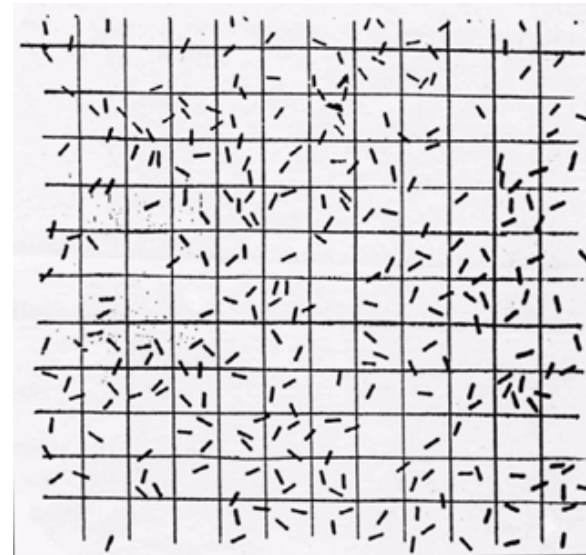
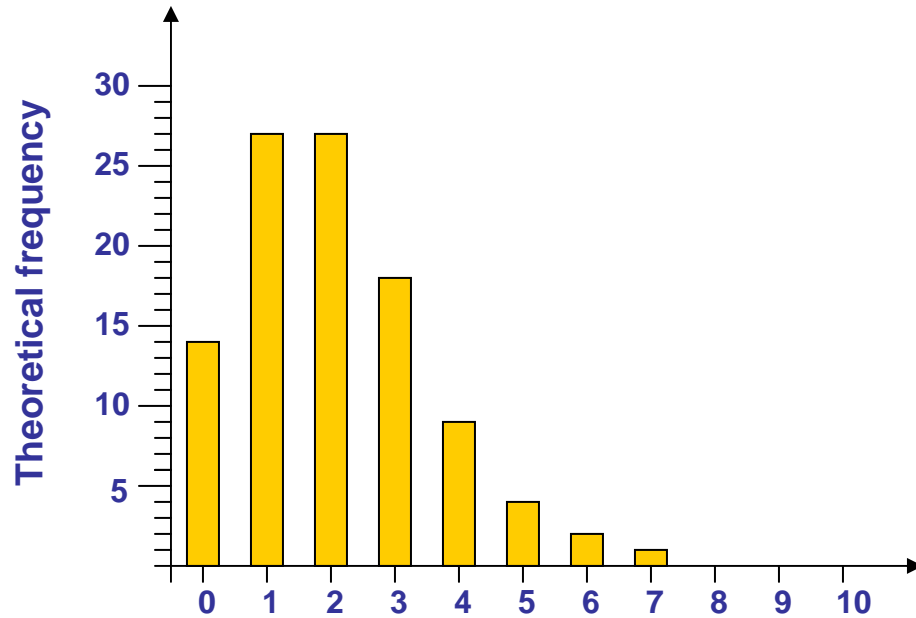
- A - C show regular distributions

- D - E show random distributions

- F shows a contagious distribution

- Precision: Poisson distribution

Random distribution of microbial counts for a given density of 2 microorganisms / ml

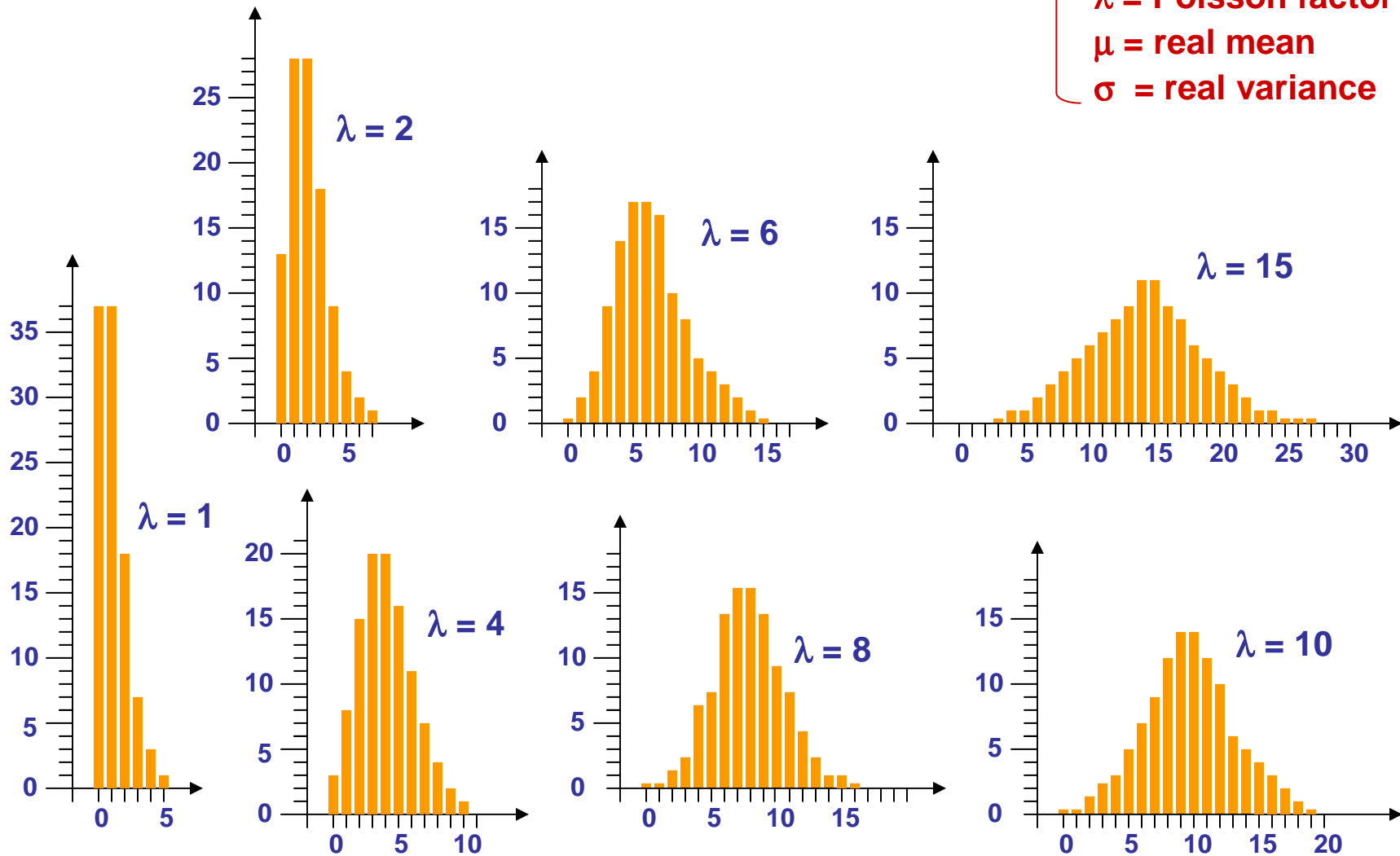


Number of microorganisms / ml

- Poisson distributions with different λ

- Poisson-distribution: $\lambda = \mu = \sigma^2$

λ = Poisson factor
 μ = real mean
 σ = real variance



- 1. Monte Carlo Simulation
mit $\lambda = 25$

$$\begin{aligned}\bar{x} &= 24.6 \\ s^2 &= 29,2 \\ s &= \pm 5.4 \\ s/\bar{x} &= 22,0 \%\end{aligned}$$

- 2. Monte Carlo Simulation
mit $\lambda = 250$

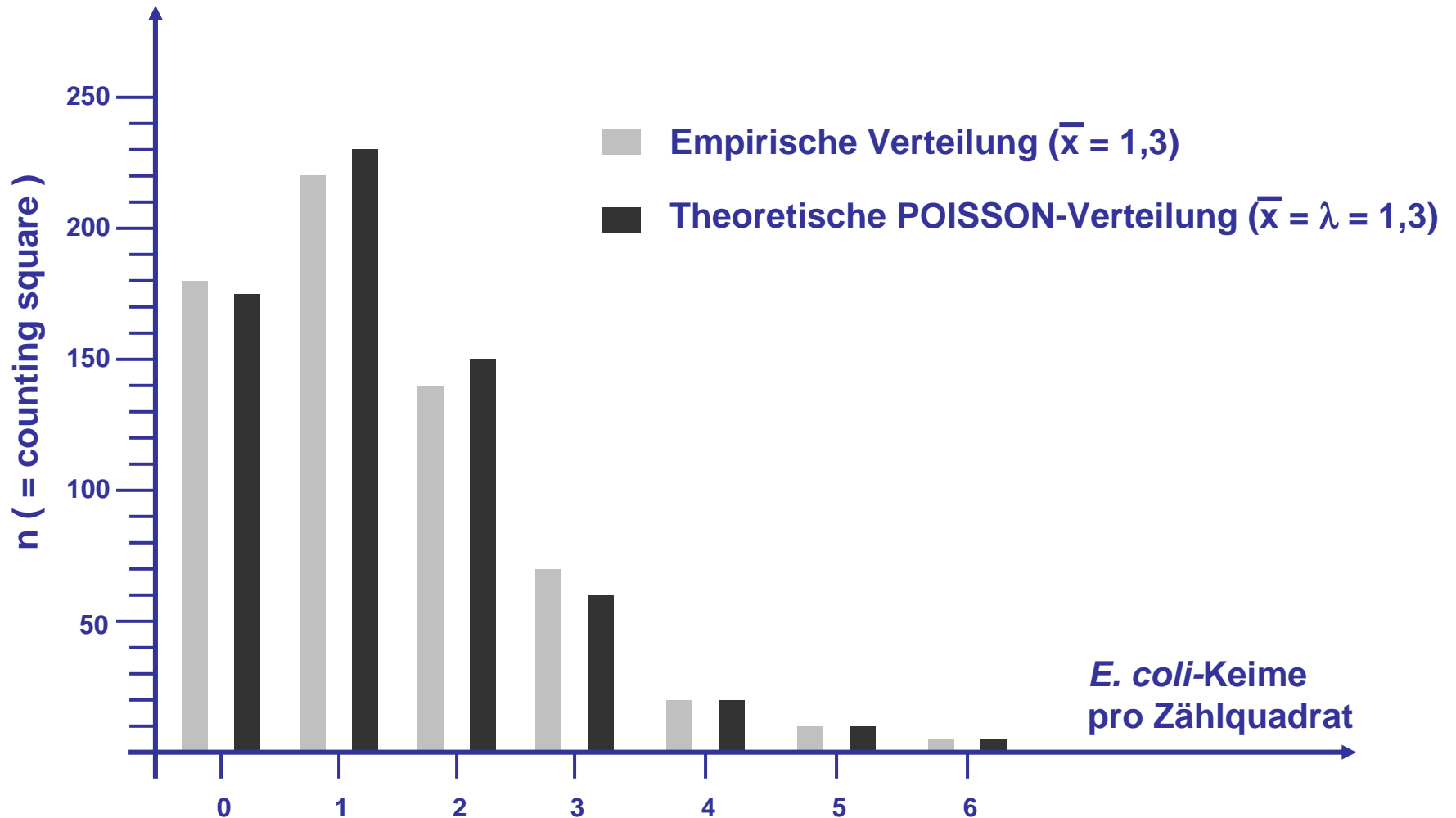
$$\begin{aligned}\bar{x} &= 248.9 \\ s^2 &= 213,2 \\ s &= \pm 14.6 \\ s/\bar{x} &= 5,9 \%\end{aligned}$$

- **Fazit:**

Der unvermeidbare Stichprobenfehler wird allein von den Koloniezahlen auf den ausgewerteten Platten bestimmt. Werden z.B. $\lambda = \bar{x} = 25$ Keime auf der Stufe 1×10^{-4} ml ausgezählt, ergibt sich ein nahezu vierfacher Variationskoeffizient (s/\bar{x}) im Vergleich zu analogen $\lambda = \bar{x} = 250$ Keimen auf der Stufe 1×10^{-3} ml.

Aus dem Endergebnis von $2,5 \times 10^5$ cfu/g geht die unterschiedliche Präzision nicht mehr hervor.

- Gegenüberstellung empirisch bestimmter und theoretisch erwarteter Keimzahlen pro Zählkammerquadrat in einem Versuch mit einer *E. coli*-Reinkultur



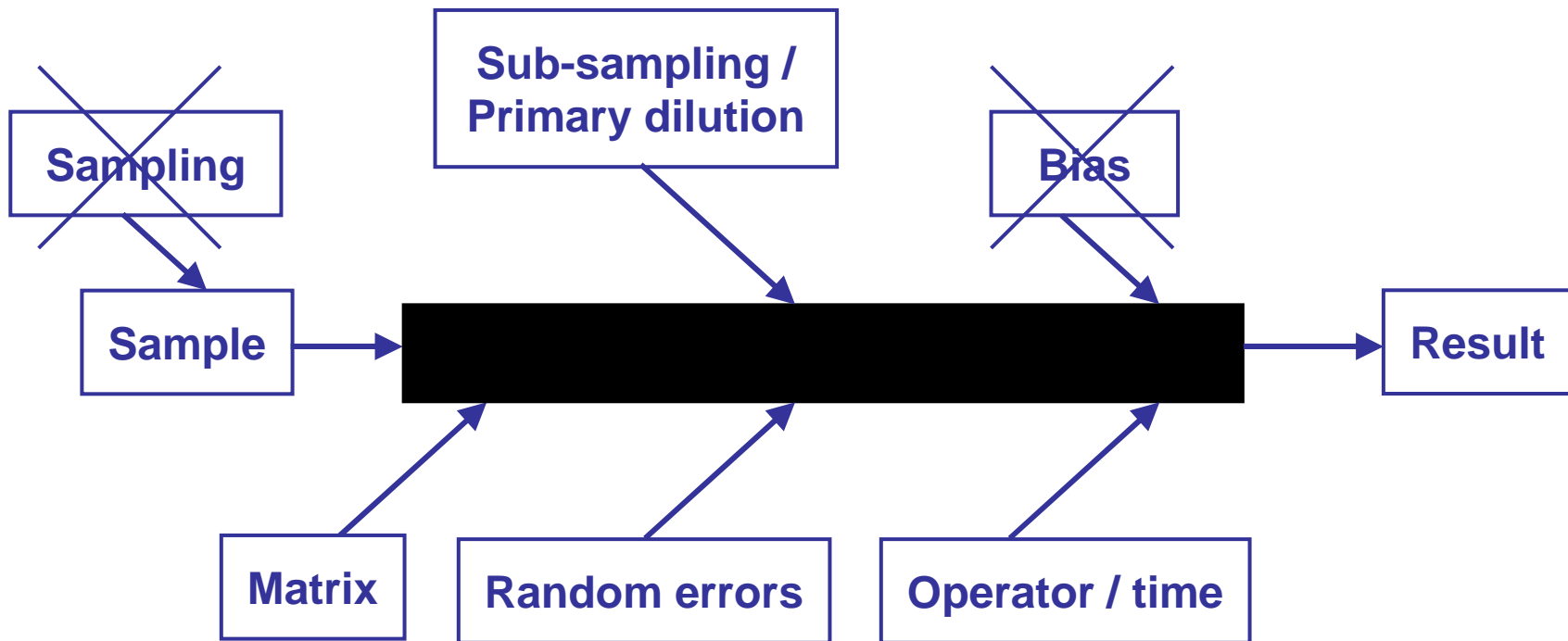
• 2. Messunsicherheit ISO/FDTS 19036

- Vorbemerkungen zum Begriff „Unsicherheit“
- Der Begriff „Fehler“ bezeichnet eine (Mess-) Abweichung, welche die Differenz zwischen individuellem Ergebnis und wahren Wert wiedergibt. Der Wert einer Messabweichung kann zur Korrektur herangezogen werden.
- Gemäß des allgemeinen ISO-Konzepts des Zweifels ist “Unsicherheit / Uncertainty“ „ein Parameter, assoziiert mit dem Ergebnis einer Messung, der die Streuung der Werte charakterisiert, die zutreffender Weise der Messgröße zugeordnet werden können.“ Der Parameter kann z.B. eine Standardabweichung oder die Breite eines Konfidenzintervalls sein. Die Messunsicherheit kann aus vielen Quellen stammen, z.B. unvollständiger Definition, Probenahme, Matrixeffekten, Interferenzen, Umgebungsbedingungen, Lagerungseinflüssen, Referenzwerten, Annahmen, zufälligen Abweichungen und anderen. Der Wert der Unsicherheit, z.B. in Form eines Intervalls, darf allgemein nicht zur Korrektur eines Messergebnisses verwendet werden.

- **Unsicherheit in der quantitativen Mikrobiologie**

Gemäß Working Draft ISO/PDTS 19036 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guide on estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations“ charakterisiert der Parameter “Uncertainty“ einer Messung diejenige Streuung der Daten, die vernünftiger Weise dem Merkmalswert (= measurand = a physical parameter quantified by measurement) zugeschrieben werden kann. Hierfür wurde das Modell einer “black box“ entwickelt.

- Diagram of the main sources of uncertainty in food microbiology, and the “black-box” approach to measurement uncertainty for each target microorganism (ISO/PDTS 19036)



- Zum ISO/PDTS “black-box“ – Modell sind folgende Anmerkungen geboten:
- 1. Wie in der Mikrobiologie üblich, wird auf die Erfassung systematischer Fehlerkomponenten (“Bias“) innerhalb des Modells verzichtet. Systematische Abweichungen müssen ggf. durch Untersuchung von Referenzmaterial erfasst werden.
- 2. Streuungen beim Anlegen der Erstverdünnung (auch Ansatzfehler genannt) werden der Probenvarianz zugeordnet. Im eigentlichen Sinne zählen sie aber zu den methodischen Fehlern, da sie Ausdruck einer unzureichenden Homogenisierung bei der Probenaufbereitung sind.

- 3. Zwischen dem unvermeidbaren Stichprobenfehler gemäß POISSON-Verteilung ($\lambda = \sigma^2$) und den minimierbaren ungerichteten Methodenfehlerkomponenten wird nicht differenziert.

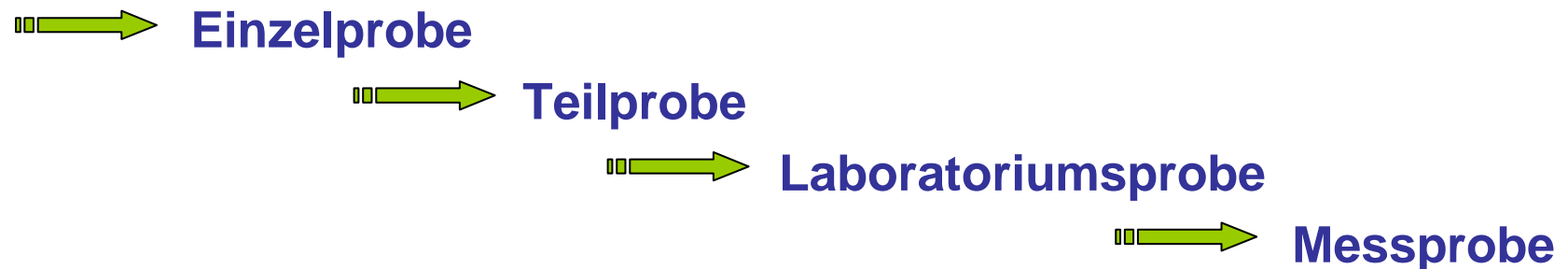
Der „POISSON-Fehler“ bietet jedoch eine wesentliche Orientierungshilfe. Beim Fehlen jeglicher zufälliger Methodenfehler führt der unvermeidbare Stichprobenfehler zu einem Quotienten $s^2/\bar{x} \sim 1$ (oder $s_{wt}^2 = 0.25$) POISSON-verteilter Daten. Der Quotient aus Mittelwert und Streuung der Keimzahlen von Parallelplatten, -ansätzen bzw. -proben lässt also erkennen, ob und in welchem Ausmaß zusätzliche ungerichtete Analysenfehlerkomponenten vorliegen.

Bei homogenen Lebensmitteln (Flüssigkeiten, Pulver etc.) beträgt für die Keimzahl von Parallelproben oftmals der Quotient $s^2/\bar{x} \sim 1$, da außer der unvermeidbaren POISSON-Streuung weder Streuungen zwischen den Proben noch methodenbedingte Varianzen auftreten und die Gesamtstreuung erhöhen.

- 4. Von der Streuung zwischen den Proben wird lediglich die Komponente **“Sub-sampling“** (d. h. Aufteilung der Laboratoriums-probe in eine oder mehrere Messproben) in die Uncertainty-Ermittlung einbezogen.

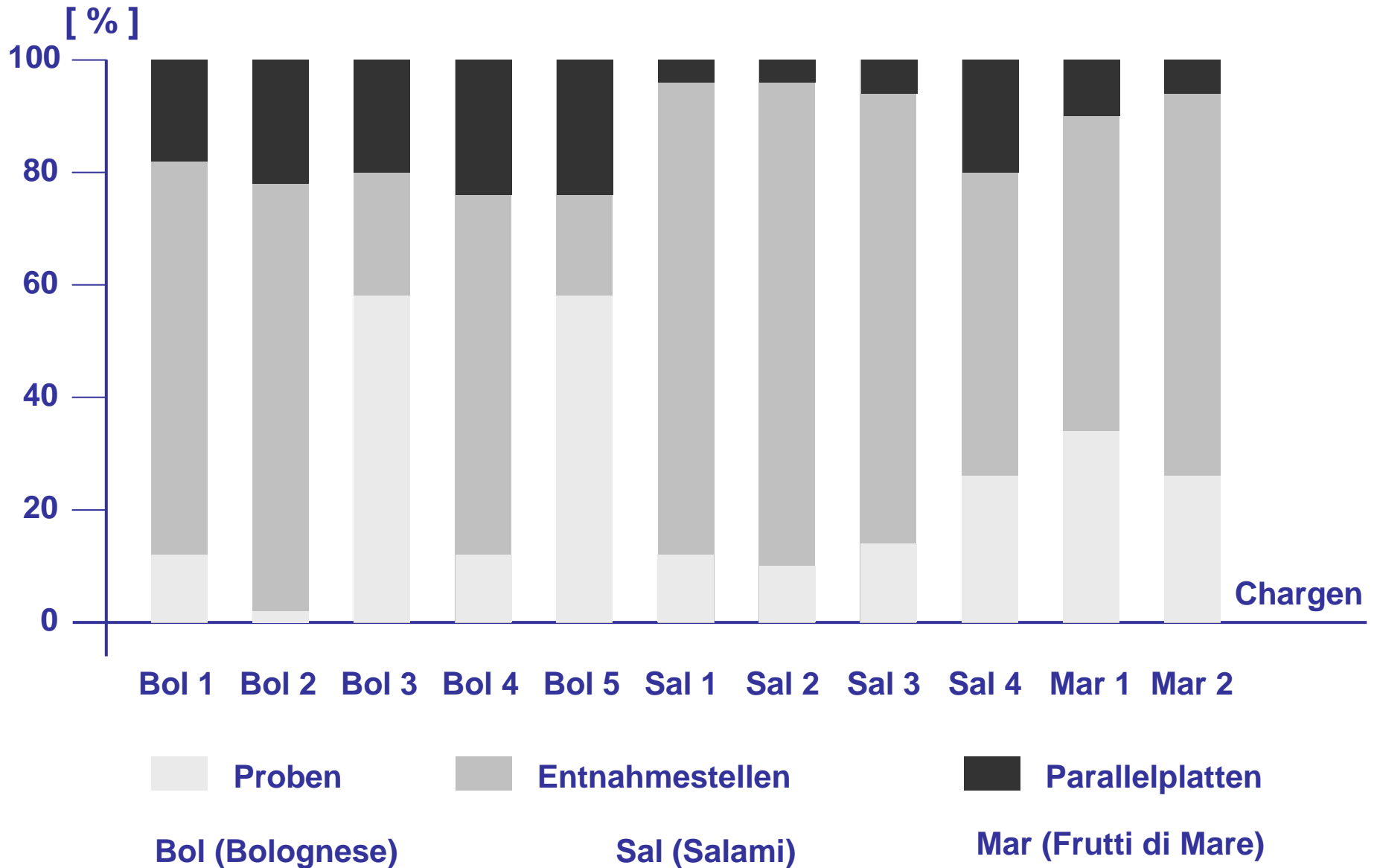
Die Streuung zwischen den Laborproben ist aber nur eine der Varianzkomponenten der Probenvarianz, deren Anteil an der Gesamtstreuung darüber hinaus erheblich schwankt.

Durch intelligente Aufbereitung muss versucht werden, die Streuungszunahme bei den Schritten



zu vermeiden oder mindestens zu minimieren.

- **Prozentualer Anteil der Varianzkomponenten an der Gesamtvarianz bei der Bestimmung der Gesamtkeimzahl von Pizzaprobe**



- 5. Die Messungenaugigkeit muss gemäß ISO-Working Draft für jeden Zielkeim und jeden Lebensmitteltyp mit mindestens 10 Proben je Matrix ermittelt werden.

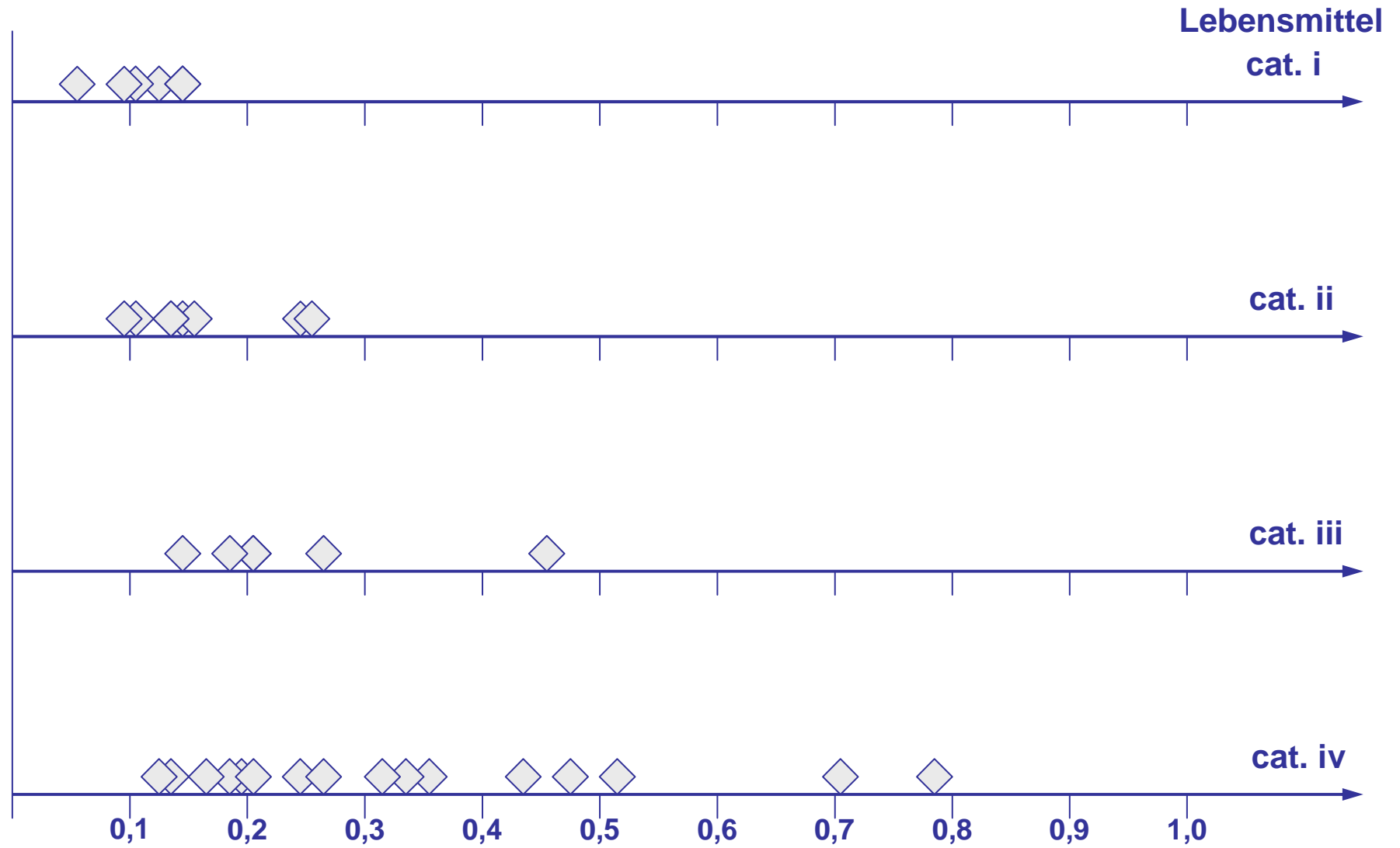
Der hohe Aufwand steht aber in keinem günstigen Verhältnis zum Informationsgewinn, weil

- die art- oder gruppenspezifischen Nachweistechniken sich in den ermittelten Keimzahlen selten systematisch unterscheiden
- die Ergebnisstreuung parallel zur Heterogenität der Matrices zwar durchschnittlich zunimmt, aber auch sehr inhomogenes Material Resultate mit niedriger Streuung liefern kann. Gerade für heterogenen Lebensmittel, bei denen sich die Frage der Messunsicherheit vordringlich stellt, ist somit die Ableitung der konkreten Ergebnisstreuung aus Vorversuchen nicht möglich.

Es besteht lediglich die Gewissheit, dass flüssige und rieselfähige Produkte quantitative Resultate mit einer niedrigen Streuung in Nähe des POISSON-Fehlers liefern, sofern nach der Herstellung keine Vermehrungs- bzw. Absterbeprozesse stattfinden.

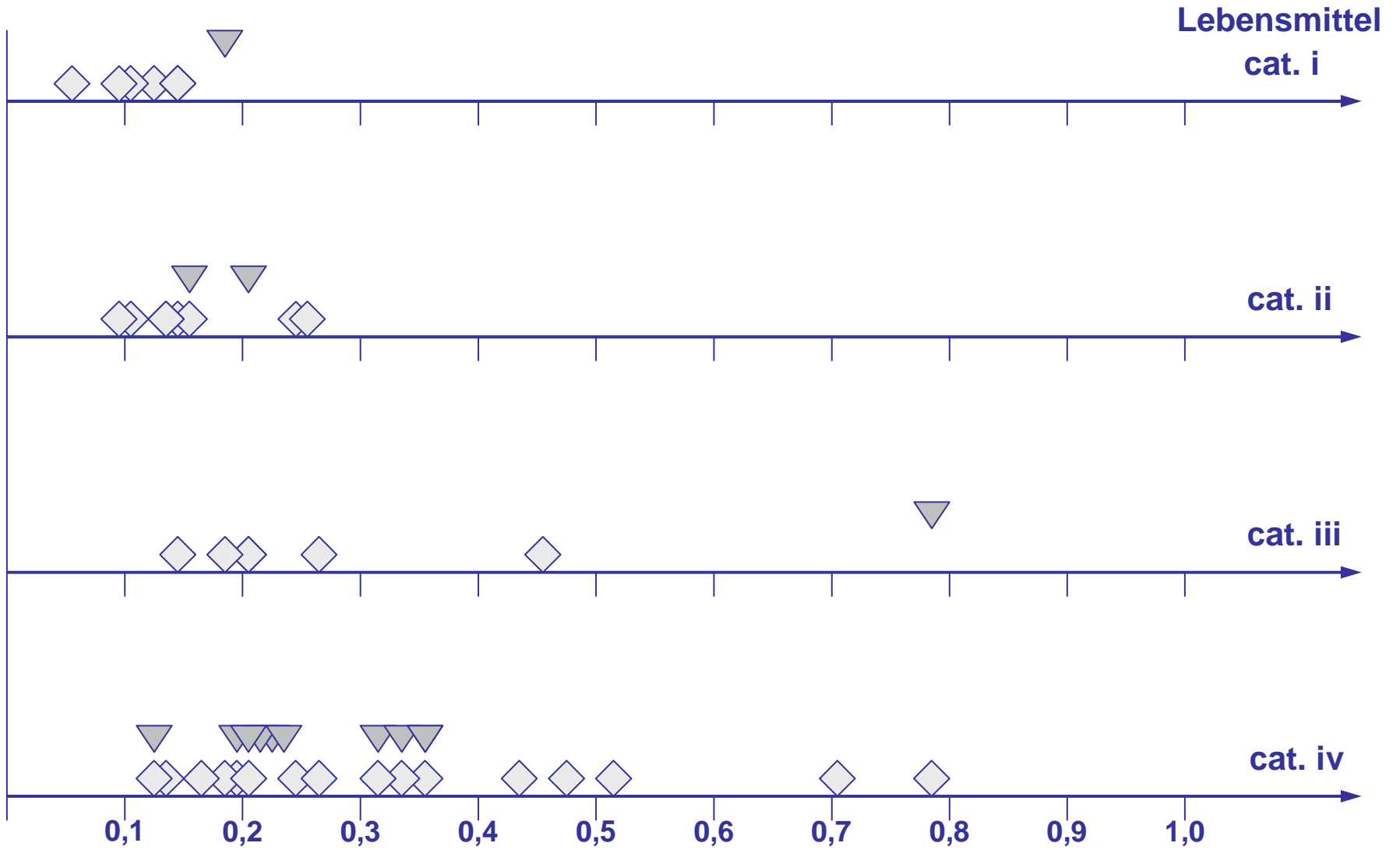
- s_R – Auswertung der Resultate AFSSA 2003/2004

◇ aerobe mesophile total count



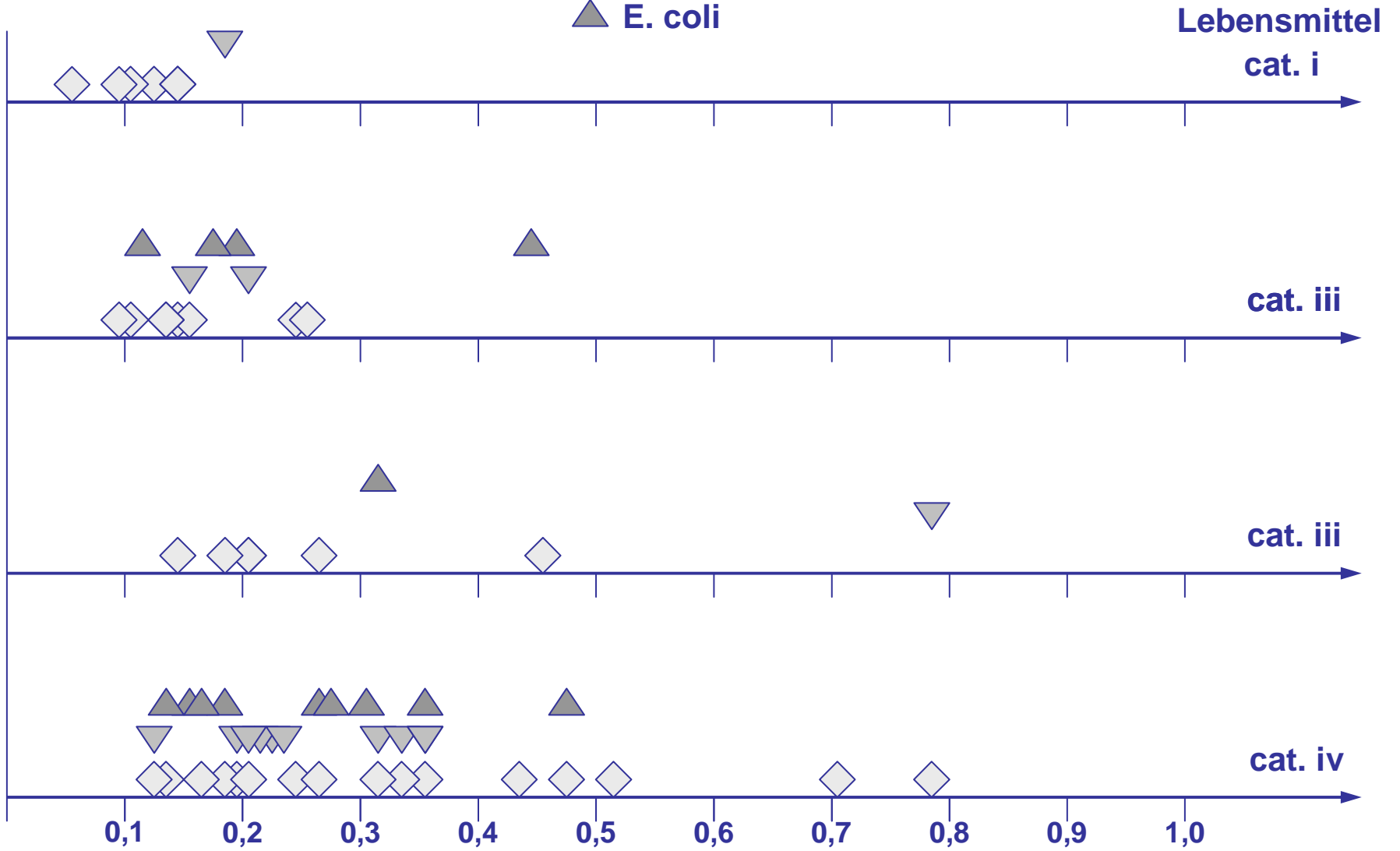
• s_R – Auswertung der Resultate AFSSA 2003/2004

◆ aerobe mesophile total count ▼ coliforms



• s_R – Auswertung der Resultate AFSSA 2003/2004

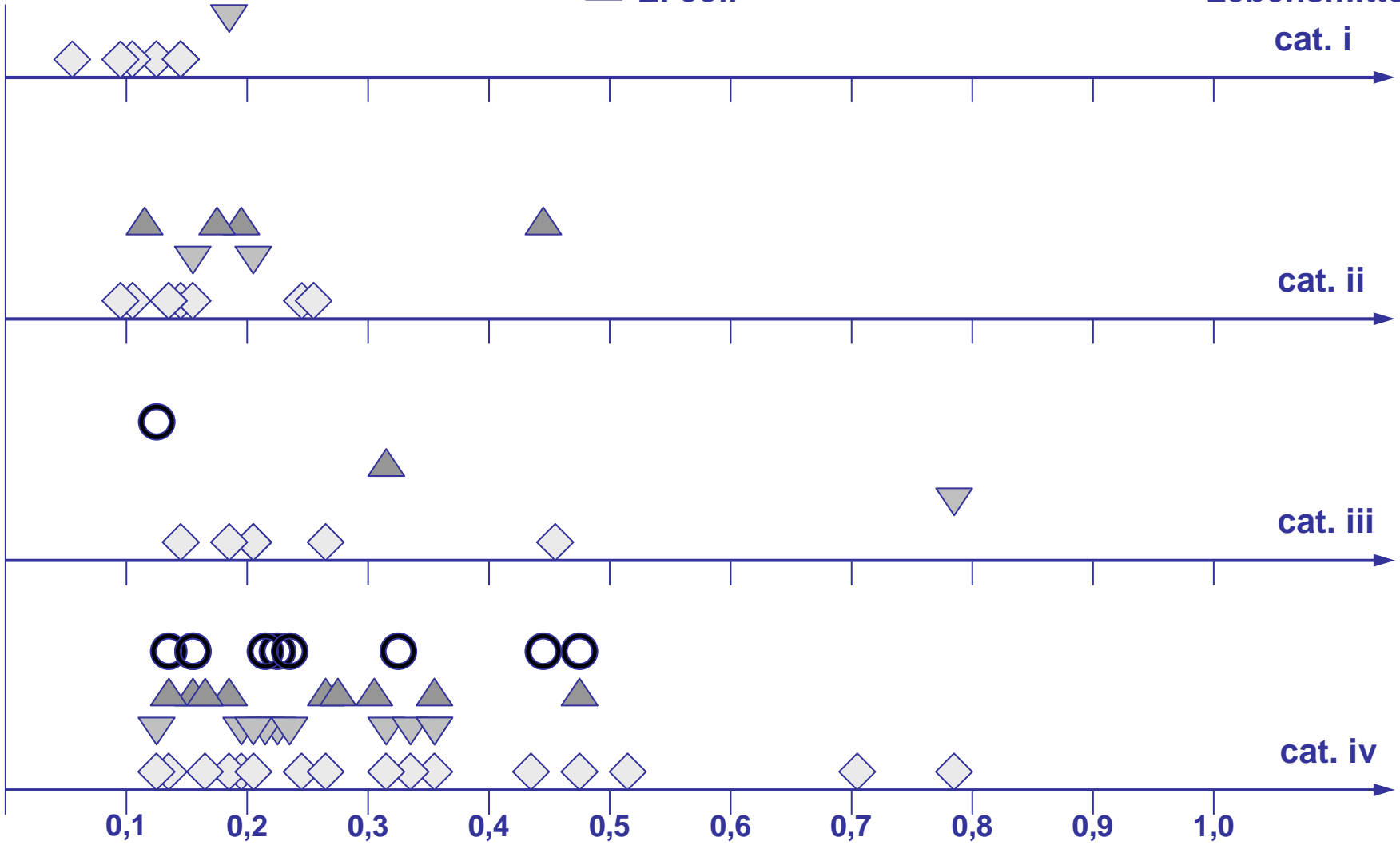
aerobe mesophile total count
 coliforms
 E. coli



• s_R – Auswertung der Resultate AFSSA 2003/2004

◆ aerobe mesophile total count ▼ coliforms ○ coagulase-positive staphylococci
 ▲ E. coli

Lebensmittel



• 3. Merkmalsstreuung und Entscheidungsregeln

- Ein mikrobiologisches Kriterium besteht aus 5 Komponenten:
 1. Zu ermittelndes mikrobiologisches Merkmal
 2. Nachweisverfahren
 3. Zahl der Stichproben und ggf. ihre Größe
 4. Mikrobiologische Grenzwerte / Limits für die überwachte Stufe
 5. Annahmezahl (= Zahl der Einzelstichproben in der Gesamtstichprobe, die unter dem Grenzwert liegen müssen)

Anmerkung: Der Begriff Kriterium wird oft auch im engeren Sinne des mikrobiologischen Grenzwertes gebraucht. So z. B. SANCO 4198 / 2001:
“a microbiological criterion is a criterion defining the acceptability of a product ... based on the ... number of microorganisms ... per unit(s)“

- **Problemstellung:**

Die Beeinträchtigung der Präzision von Messergebnissen muss bei der Befundinterpretation – so auch bei der Gegenüberstellung von Analysenresultat und Grenzwert – Berücksichtigung finden.

- Für den Fall des Nachweises einer Grenzwertüberschreitung bestehen **zwei verschiedene Lösungsansätze**, unabhängig davon, ob der Einzel- oder der Mittelwert der Stichprobe(n) zur Beurteilung herangezogen werden.

- 3.1 Um das Analysenresultat wird auf der Basis der Analysenstreuung ein Schätzintervall gebildet
- 3.2 Die Analysenstreuung wird bei Festlegung des Grenzwertes berücksichtigt

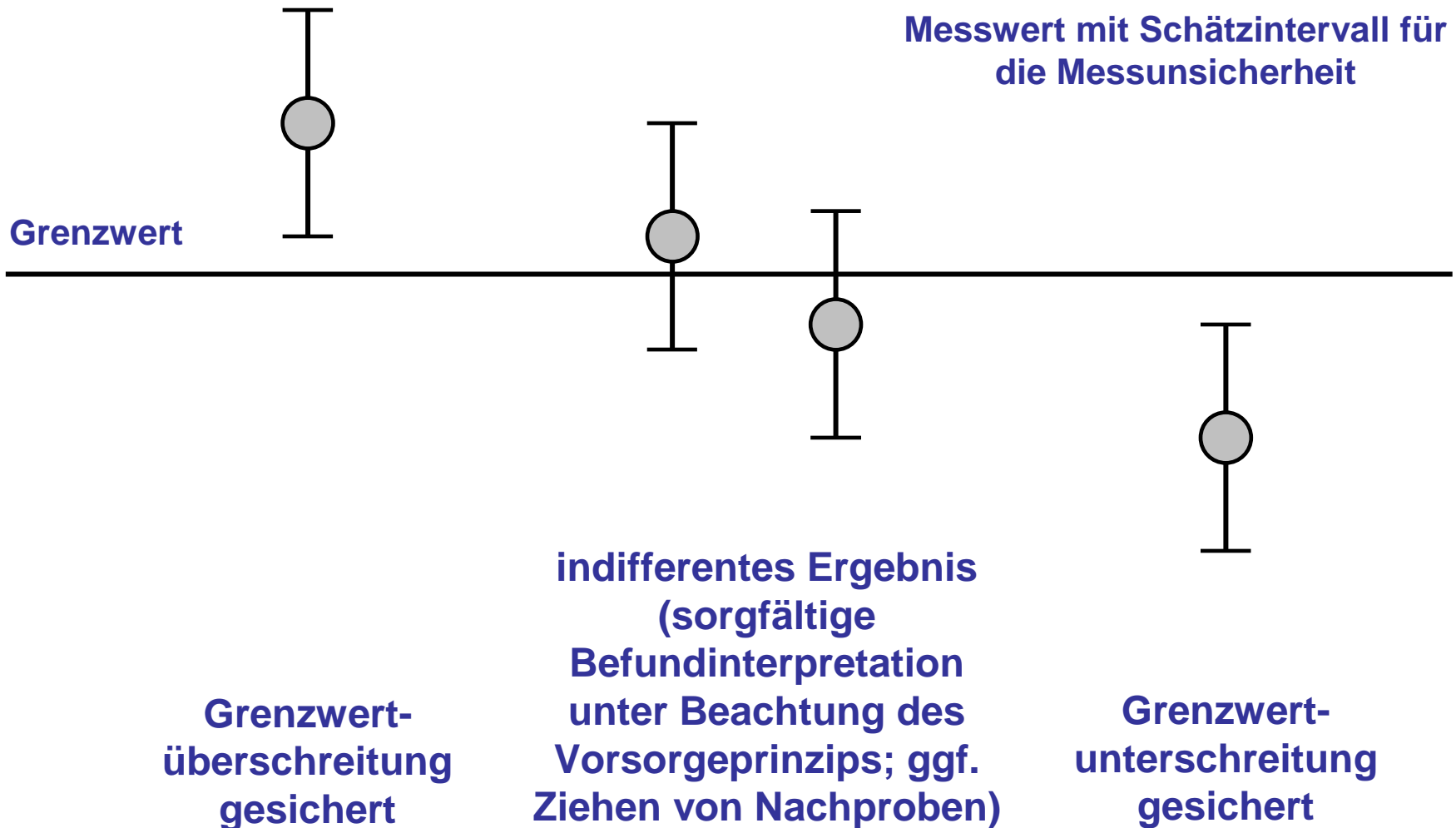
- zu 3.1 **Um das Analysenresultat wird auf der Basis der Analysenstreuung ein Schätzintervall gebildet.**

Eine Beanstandung erfolgt nur, wenn das Ergebnis mit Sicherheit den Grenzwert überschreitet, d. h. die Untergrenze des Schätzintervalls über dem Grenzwert liegt.

Die Analysenstreuung, auf deren Basis das Schätzintervall berechnet wird, lässt sich bestimmen als

- Erfahrungsvarianz, deren Einhaltung mittels eines QS-Systems überwacht wird
- konkrete Methodenstreuung durch Paralleluntersuchungen der Probe

- Messunsicherheit und Beurteilungssituation:
Schätzintervall**



- **Beispiel**

Bezüglich “contaminants in food“ (Council Regulation (EEC) No. 315/93) und “undesirable substances in feed“ (Directive 2002/32/EC) wird folgende Entscheidungsregel gegeben (Report on the relationship between analytical results ...)

“Enforcement action is only taken when the analyst is sure that the specification has been exceeded. This is consistent with the requirement to prove beyond reasonable doubt that a limit has been exceeded if the case should come to court.”

- zu 3.2 Die Analysenstreuung wird bei Festlegung des Grenzwertes berücksichtigt durch

- direktes Einbeziehen in den Grenzwert

- **Beispiel:**

„ ...die nachfolgend bei den einzelnen Fleischerzeugnissen angeführten Analysenwerte für das bindegewebsfreie Fleischeiweiß im Gesamteiweiß ... sind Mindestwerte ... Streuungen, die sich auch bei gleich bleibender Rezeptur aus den Herstellungsbedingungen oder aus der Untersuchungsmethode ergeben können, sind berücksichtigt, weitere Toleranzen also nicht erforderlich.“

(Leitsätze für Fleisch und Fleischerzeugnisse des Deutschen Lebensmittelbuches, Nr. II)

- Festlegung einer zur Beurteilung dienenden **Toleranzgrenze**, welche den Grenzwert um die Messunsicherheit korrigiert

- **Beispiele:**

- **Good – Marginal – Bad – Gruppierung oder Ampelsysteme zur Klassifizierung von Einzelergebnissen**
z. B. Milch-GüteVO: Bewertung des geometrischen Mittels

Klasse 2 über 100 000 Keime/ml → Abschlag

Klasse 1 bis 100 000 Keime/ml → üblicher Auszahlungspreis

Klasse s bis 50 000 Keime/ml → Zuschlag

- **Vorgabe einer Analysentoleranz**

z. B. FLHV Anlage 2a Nr. 9.4:

“... Für die Bewertung der Ergebnisse wird eine methodische Toleranz eingeräumt. Eine Richtwertüberschreitung liegt vor, wenn der Tabellenwert für m

- bei einer Keimzählung in festen Medien um das Dreifache**
- bei einer Keimzählung in flüssigen Medien um das Zehnfache**

überschritten wird.”

- **Annahme – bzw. Rückweisezahlen von Stichprobenplänen mit variablem n**

(z. B. § 35 – Methode Histometrie; kaum für Mikrobiologie geeignet)

- Messunsicherheit und Beurteilungssituation:
Toleranzgrenzen**



- **Gibt es rechtliche Vorgaben, wonach die Messunsicherheit bei der Beurteilung mikrobiologischer Ergebnisse mit Hilfe eines Grenzwertes Berücksichtigung finden muss ?**
- **SANCO 4198/2001**

“(6) food business operators must comply with microbiological criteriaIt is therefore appropriate to lay down implementing measures **concerning the analytical methods, including, if necessary, the measurement uncertainty**, the sampling plan, the microbiological limits, the number of analytical units that should comply with these limits, and concerning also the foodstuff to which the criterion applies, the points of the food chain where the criterion applies, as well as the actions to be taken when the criterion is not met.”

- **Anmerkungen:**
- **Punkt (6) gibt nur unklare Hinweise, zumal**
 - **primär food business operators angesprochen werden**
 - **Hersteller das Unterschreiten der Limits absichern müssen und nicht das Überschreiten**
 - **der Begriff „criterion“ widersprüchlich verwendet wird**
 - **Messunsicherheit nur zu berücksichtigen ist „if necessary“**

- **SANCO 4198/2001 (25)**

“The microbiological criteria set in this regulation should be open to review and revised or supplemented, if appropriate, in order to take into account developments in the field of food safety and food microbiology. This includes progress in science, technology and methodology.”

- **Anmerkung: criterion meint hier “Grenzwert”**

- **Weit eindeutiger zum Umgang mit der Messunsicherheit bei der Beurteilung nach mikrobiologischen Grenzwerten äußert sich die Codex Alimentarius Commission CAC/GL 21 – 1997 Ziffer 5.3.2:**

“.... Microbiological limits should also take account of the likelihood of uneven distribution of microorganisms in the food and the inherent variability of the analytical procedure.”

- 4. Mehrere Gründe sprechen dafür, dass die Grenzwerte bereits die Messunsicherheit (ebenso wie ggf. die systematischen Fehler) berücksichtigen.

- 4.1 Hygieneparameter (process hygiene criterion)

- 4.1.1 Grenzwerte für Hygiene-Parameter werden üblicher Weise aus empirischen Daten abgeleitet. Diese Werte enthalten stets den Messfehler und werden nicht nachträglich korrigiert, was zu engeren Häufigkeitsverteilungen und damit niedrigeren Limits führen würde.

- 4.1.2 Die gängigen 3-Klassen-Pläne mit $n = 5$ sehen für die Grenze m die Annahmezahl $c = 2$ vor. Diese Strategie entspricht einer Mittelwertprüfung, wodurch sich das Fehlentscheidungsrisiko ohnehin nach der \sqrt{n} – Regel reduziert.
- 4.1.3 Wird bei 3-Klassen-Plänen ein Abstand zwischen m und M von einer Zehnerpotenz für heterogene und einer halben für homogene Güter eingehalten, ist erfahrungsgemäß die Messunsicherheit einbezogen und die Beurteilung der Ergebnisse in Bezug auf M mit $c = 0$ unterliegt keinem erhöhten Fehlentscheidungsrisiko.
- 4.1.4 Das Risiko einer falschen Beanstandung muss auch im Hinblick auf ihre Folgen sowohl für den Unternehmer als auch den Verbraucher gewichtet werden. Nur in den seltensten Fällen “the case should come to court“.

● 4.2 Pathogene Keime und Food Safety Criteria

- **Konsumentenrisiko**: Die Beurteilungsgrenzen (Food Safety Criteria) basieren auf Food Safety Objectives, die ihrerseits einen Sicherheitsabstand von 1 bis 3, meist 2 Zehnerpotenzen von der minimalen Infektionsdosis beinhalten. Je näher die wahre Keimzahl am FSO liegt, um so seltener werden Einzelresultate das Food Safety Criterion unterschreiten.
- **Produzentenrisiko**: Unberechtigte Beanstandungen hinsichtlich eines Food Safety Criterion drohen überwiegend solchen Unternehmern, deren Produkte deutlich gegen die gute Hygienepraxis mit den Grenzwerten m und M verstoßen.

Letztlich widerspräche es dem Vorsorgeprinzip, zur Minimierung des Produzentenrisikos erst dann Maßnahmen zu ergreifen, wenn die Food Safety Criterion – Überschreitung abgesichert ist.

- **Beispiele:**

- **FIHV Art. 2a Nr. 9.5.14**

Die Qualität der Partie gilt als “gesundheitlich bedenklich oder verdorben, wenn der Keimgehalt von **10³ x m** erreicht oder überschritten wird”

- **Sonderfall:**

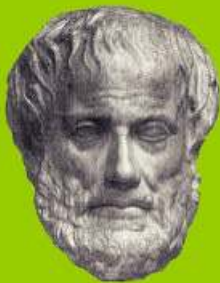
SANCO 4190/2001: “... it must be an objective to keep the concentration of *Listeria monocytogenes* in food below 100 cfu/g”.

Hier müsste sicher gestellt sein, dass der Analysenwert das Limit nicht (!) überschreitet

- 5. **Schlussfolgerungen**

Wenn Laboratorien ihre Messunsicherheit durch entsprechende QS-Maßnahmen stets unter Kontrolle halten, ist es durchaus plausibel und entspricht der gebräuchlichen Strategie, die Messunsicherheit bereits bei der Festlegung mikrobiologischer Grenzwerte zu berücksichtigen, statt jedes Einzelergebnis entsprechend zu korrigieren.

- **Merke:**



Der Gebildete stellt keine höheren Anforderungen an die Genauigkeit, als es der Natur der Sache entspricht.

Aristoteles