

Basisvalidierung zu DIN 38411-9

Bestimmung von Enterobacterial Common Antigen (ECA) zum Nachweis von Lactose-fermentierenden Enterobacteriaceae

1. Anwendungsbereich

- Das Verfahren erfaßt weitgehend Lactose-fermentierende Enterobacteriaceae ("Coliforme Keime").
In geringem Umfang können auch Lactose-negative Enterobacteriaceae erfaßt werden.
- Arbeitsbereich
 - geprüfte Matrices: Trink- und Rohwasser, Schwimm- und Badebeckenwasser
Oberflächenwasser, Badegewässer, Meerwasser, Mineral- und Tafelwasser
 - Mögliche Erweiterungen des Verfahrens: Abwasser, Schlamm
Für diese Anwendungen gilt die Basisvalidierung nicht.

2. Störungen

- Störungen, die die Selektivität / Richtigkeit / Präzision des Verfahrens beeinflussen: siehe Punkt 4 in der DIN 38411 K9

3. Chemikalien / Geräte

- Spezielle Reinigungsverfahren: bei der kulturellen Voranreicherung der Bakterien muß unter den üblichen sterilen Bedingungen gearbeitet werden. Die Durchführung des ELISA erfordert kein steriles Arbeiten
- Haltbarkeit von Chemikalien, Lösungen, Standards
Die unter 8.18.5, 8.18.6 und 8.18.8 angegebenen Lösungen sind vor Gebrauch frisch anzusetzen. Der unmarkierte und der Peroxidase-markierte Antikörper sind bei 4 °C ca. 6 Monate haltbar (Herstellerangaben beachten)
- Verfügbarkeit von Standardreferenzmaterialien: Referenzstämme sind bei Stammsammlungen, z.B. bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen zu erhalten
-
- Der markierte sowie der unmarkierte Antikörper sind beim
Inst. für Med. Mikrobiologie
Medizinische Hochschule Hannover
H. Prof. Dr. Bitter Suermann
oder bei
Riedel-de-Häen-Laborchemikalien GmbH
Seelze
H. Dr. Weisgerber
zu erhalten

4. Proben / Probenaufbereitung

- Hinweise zur Probennahme nach DIN 38411 K1
- Probenstabilität / Probenkonservierung
Probenlagerung (sofern erforderlich)

nach DIN 38411 K1

- "clean up"
Membranfiltration der Proben unter sterilen Bedingungen, z.B. 0,45 µm Nitrocellulose-Mischester

5. Kalibrierung

- Art der Kalibrierung: Verwendung von E. coli K12 Standardsuspensionen, siehe Punkte 10.3 und 11 der DIN 38411 K9 (z.B. Gesamtverfahren, Standardaddition, Verwendung interner/externer Standards, Qualität der verwendeten Standardlösungen)
- verwendete Referenz- / Kontroll- / Kalibriersubstanzen
Escherichia coli K12, Stamm DSMZ 498 oder ATCC 237 16
- kalibrierter Konzentrationsbereich (Arbeitsbereich): entfällt
incl. Dokumentation der Kalibrierfunktion bzw. -daten,
ggf. Kenngrößen nach DIN 38402 Teil 51 oder ISO 8466-2
- Präzision bei unterschiedlichen Konzentrationsniveaus. entfällt

6. Untersuchungen zur Richtigkeit

- verwendetes Referenzmaterial: E. coli K12
- Blindwerte: siehe Punkt 12 der DIN 38411 K9
- Abweichung vom Sollwert bei unterschiedlichen Konzentrationen: entfällt

7. Untersuchungen zur Wiederfindung

- eingesetzte Matrices entfällt
(bei Additions- und Aufstockversuchen)
- Höhe und Schwankung der Wiederfindung entfällt

8. Probleme bei der Probenuntersuchung / Testdurchführung

- Störungen: entfällt
(z.B. "Memory"-Effekte, Peaküberlappungen)
- besondere Durchführungsschwierigkeiten: entfällt
(z.B. besondere Testbedingungen wie Temperatur, Durchmischungstechniken)

9. Verfahrenskenndaten zur Kontrolle der Richtigkeit, Präzision, Robustheit (aus Ringversuchen)

- analysierte Parameter: Lactose-fermentierende Enterobacteriaceae

- verwendete Referenzmaterialien: Referenzstämme des Niedersächsischen Landesgesundheitsamtes (z.B. Herkunft, Reinheit)
- untersuchte Matrices: Phosphat-Borat-Acetat-Puffer bzw. Entfernen der Matrix durch Membranfiltration (ggf. Aufstockung)
- untersuchte Konzentrationsniveaus 30 - 130 KBE/100ml (incl. Soll-Wert und mittlerer Ist-Wert)
- Zahl der teilnehmenden Labors 10 - 11
- Ausreißerquote: 0
- Wiederholvariationskoeffizient: entfällt
- Vergleichsvariationskoeffizient: entfällt
- Nachweis- und Bestimmungsgrenze: entfällt (z.B. nach DIN 32645)
- ggf. Vergleich mit Ergebnissen anderer Verfahren: entfällt

Zusätzliche Validierungskriterien für biologische Testverfahren

Bei der Entwicklung und Normung von biologischen Testmethoden sind die Grundsätze und Hinweise der DIN 38412 Teil 1 "Allgemeine Hinweise zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer Testverfahren" zu berücksichtigen. Zusätzlich sollten auch die folgenden Kriterien beachtet werden.

1. Biologische Systeme: entfällt

Angabe zu den verwendeten Testorganismen und den biologischen Materialien, z.B.

- Herkunft und Bezugsmöglichkeiten,
- Vorbehandlung, Akklimatisation, Adaption,
- Aufbewahrung, Hälterung, Zucht,
- Nahrung, Futterqualität,
- Qualitätskriterien der Testorganismen (z.B. Alter und Länge bei Fischen, Hälterungsmortalität),
- Zeitintervall, in denen ein Einsatz möglich ist (z.B. jahreszeitlich bedingte Probleme bei Goldorfen).

2. Proben und Probenvorbereitung

- Probenahme: entsprechend DIN 38411 K1 (insbesondere wichtig für mikrobiologische Untersuchungen wie Keimzahlbestimmung)

- geeignete und ungeeignete Probenkonservierungsbedingungen und -techniken

3. Kalibrierung

- Auswahl und Einsatz geeigneter Referenz- oder Kontrollsubstanzen, um die Empfindlichkeit der Organismen zu kennen oder die Abbaupotenz eines Inokulums zu definieren.
- Verwendung von Referenz- oder Kontrollsubstanzen in Ökotoxizitätstests, die unter den Testbedingungen stabil und bei der Testkonzentration in Lösung bleiben.
- Verwendung von Referenz- oder Kontrollsubstanzen in Abbautests, die unter den Testbedingungen ein geeignetes, reproduzierbares Abbauverhalten zeigen.
- Messung und Berücksichtigung von Blindwerten, um Effekte der Testumgebung ohne das Testgut auf die Testorganismen zu erfassen.
- Vergleich der Meßwerte, die mit Referenz- oder Kontrollsubstanzen und Blindwerten in Ringversuchen erhalten wurden, um eine Aussage zur Reproduzierbarkeit der Methode machen zu können.

4. Analytik und Informationen über Testsubstanzen: entfällt

- Eignung und Reproduzierbarkeit der vorgesehenen Analytik als Meßparameter in Abbautests.
- Hinweise, ob und welche Angaben über die Testsubstanzen bei der späteren Anwendung der Testmethode vorliegen sollten.

5. Testansätze und Testdurchführung

- Etablierung von Kriterien zur Prüfung von Testsubstanzen in realitätsnahen Matrices (z.B. in Testsystemen mit Abwässern).
- Etablierung von Prüfkriterien oder Kriterien zum Ausschluß problematischer Testsubstanzen bei Abbauprüfungen (z.B. bei schwer wasserlöslichen, leicht flüchtigen oder rasch hydrolysierenden Stoffen, Informationen zur Homogenität).
- Etablierung von Kriterien zur Erreichung einer ausreichenden Verteilung schwer wasserlöslicher Stoffe in Testansätzen für Abbauprüfungen (z.B. Verteilungstechniken, Zugabe dispergierender Agenzien, erforderliche Kontrollansätze, Vermeidung toxischer Lösemittel).
- Zugabe der Testsubstanz in die Testsysteme (z.B. gleichmäßige Verfügbarkeit der Testsubstanz über die Testdauer, geeignete Konzentration der Stammlösung, Dosieretechniken).
- Definition des Anwendungsbereichs und der Auswertekriterien für problematische Testsubstanzen in Ökotoxizitätstests (z.B. wann ist ein Stoff ausreichend wasserlöslich).
- Etablierung von Kriterien zur Erkennung der Stabilität von Prüfsubstanzen

in Testansätzen (z.B. Erkennen oder Vermeiden von Abbauprozessen in ökotoxikologischen Tests).

- Etablierung von Kriterien zur Erkennung toxischer Wirkungen in Abbautestsansätzen (z.B. Inhibitionsansatz, um Persistenz von schlechter Abbaubarkeit bei zu hoher Testkonzentration zu unterscheiden).
- Festlegung geeigneter Testbedingungen (z.B. pH, Temperatur, Schütteln, Belüftung).
- Festlegung und ggf. Begründung der Wahl des Test- oder Kulturmediums.
- Festlegung und ggf. Begründung der Wahl des gemessenen Effektes (z.B. Schwimmunfähigkeit in Daphnientests).
- Vorsehen von Plausibilitätskontrollen und ggf. statistische Behandlung der Meß- und Kontrollwerte.

6. Verfahrenskenndaten

Bei der Interpretation von Ergebnissen aus Ringversuchen mit biologischen Testmethoden sollte berücksichtigt werden, daß die Anforderungen an Präzision, Wiederfindung oder Reproduzierbarkeit in der Regel anders zu bewerten sind als bei chemisch-analytischen Untersuchungen.

Anlage zum Validierungsprotokoll der DIN 38411 K9

1 Organisation der Ringversuche

1.1 Durchführung der Ringversuche

Zur Validierung der DIN 38411 K9 wurden insgesamt zwei Ringversuche am 29.10.1997 und am 29.4.1998 durchgeführt. Die Dotierung, Bereitstellung und Versand der Proben erfolgte durch das

Niedersächsische Landesgesundheitsamt (NLGA)
Außenstelle Aurich
Lichtenburger Weg 24
26603 Aurich

unter der Leitung von H. Dr. Heinemeyer. H. Dr. Heinemeyer sammelte die Ergebnisprotokolle der teilnehmenden Laboratorien, überprüfte die Ergebnisse der Untersuchungen auf ihre Richtigkeit und leitete die Befunde an Fr. Donnevert von der Fachhochschule Gießen weiter. Fr. Donnevert wertete die Untersuchungsergebnisse aus.

1.2 Herstellung der mit Bakterien dotierten Proben

Die Herstellung der dotierten Proben erfolgte nach einem durch das NLGA entwickelten Verfahren, daß bisher nicht publiziert ist. Während der Dotierung der Proben wird die Stammbakteriensuspension unter ständigem Rühren gehalten, um ein Absetzen der Bakterien zu verhindern. Die Probenmatrix besteht aus einem Phosphat-Borat-Acetat-Puffer.

1.3 Versand der Proben

Die Proben wurden durch den Paketdienst der Post an die Teilnehmer ungekühlt verschickt. Sie erreichten die teilnehmenden Laboratorien innerhalb 1,5 bis 2 Tagen.

1.4 Teilnehmende Laboratorien

An dem **1. Ringversuch am 29.10.1997** nahmen die folgenden 10 Laboratorien teil:

Hamburger Wasserwerke GmbH
Billhorner Deich 2
20539 Hamburg
H. van Assche

Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg
Wiedenboldstr. 15
70174 Stuttgart
Fr. Dr. Sacré/Fr. Dr. Klittich

Inst. für Med. Mikrobiologie
Medizinische Hochschule Hannover
Carl-Neuberg-Str. 1

30625 Hannover
H. Prof. Dr. Bitter-Suermann

ESWE Stadtwerke Wiesbaden AG
Söhnleinstr. 158
65201 Wiesbaden
H. Dr. Schneider

Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene
Heinrich-Heine-Str. 12
08645 Bad Elster
Fr. Dr. Feuerpfeil

Stadtwerke Mainz AG
Rheinallee 41
55118 Mainz
Fr. Dr. Obst/Fr. Dr. Wiegand-Rosinus

Landesgesundheitsamt Südbayern
Veterenstr. 2
85764 Oberschleißheim
H. Dr. Schindler

Kommunale Wasserwerke Leipzig GmbH
Am Wasserwerk
04299 Leipzig
Fr. Kind

Hygiene Institut Dr. Berg
Med. Untersuchungsstelle
Dürener Str. 27
52249 Eschweiler
H. Dr. Jaeger

Gas-, Elektrizitäts- und Wasserwerke Köln AG
Parkgürtel 24
50823 Köln
Fr. Dr. Hübner

An dem **2. Ringversuch am 29.04.1998** nahmen insgesamt 11 Laboratorien teil. Die Gruppe bestand aus allen Teilnehmern des 1. Ringversuchs außer dem Labor der Kommunalen Wasserwerke Leipzig GmbH sowie zusätzlich aus den folgenden beiden Laboratorien:

Institut Fresenius
Im Meisel
65232 Taunusstein
H. Dr. Dobberstein

Niedersächsische Landesgesundheitsamt
Außenstelle Aurich

Lichtenburger Weg 24
 26603 Aurich
 H. Dr. Heinemeyer

Das Labor der Medizinischen Hochschule Hannover gab aus internen, organisatorische Gründen bei beiden Ringversuchen keine Ergebnisse ab.

2 Auswertung der Ergebnisse

Auswertung des 1. Ringversuchs vom 29.10.1997

Beim 1. Ringversuch hatten 10 Laboratorien teilgenommen, davon hatten 9 Ergebnisse abgegeben. Es waren 6 verschiedene Probentypen verteilt worden, jedes Labor erhielt insgesamt 16 Proben in unterschiedlichen Kombinationen.

Tab. 1: Proben mit unterschiedlichen Dotierungen des Ringversuchs vom 29.10.1997

E.coli (Lactose-positiv)	ca. 30/100 ml
E.coli (Lactose-positiv)	ca. 60/100 ml
Proteus (Lactose-negativ)	ca. 100/100 ml
Klebsiella (Lactose-positiv)	ca. 60/100 ml
Aeromonas (Lactose-positiv, Nicht-Enterobacteriaceae)	ca. 100/100 ml
nicht dotierte Probe	

Tab. 2: Zusammenfassung der Ergebnisse des Ringversuchs vom 29.10.1997

Dotierung je 100 ml	Anzahl Labors	Anzahl Ergebnisse	ECA	
			Anz. pos./Anteil pos.	Anz. neg./Anteil neg.
E. coli 30	9	27	17 (63 %)	10 (37 %)
E. coli 60	9	27	27 (100 %)	0 (0 %)
Klebsiella 60	9	27	27 (100 %)	0 (0 %)
Proteus 100	9	27	27 (100 %)	0 (0 %)
Aeromonas 100	9	27	27 (100 %)	0 (0 %)
Blindwert (nicht dotiert)	9	9	0 (0 %)	9 (100 %)

Die nicht-dotierten Proben sowie die mit Aeromonas dotierten Proben ergaben einen negativen ECA-Befund. Alle mit Enterobacteriaceae dotierten Proben, außer ein Teil der niedrig mit E.coli dotierten Proben, wiesen ein positives ECA-Ergebnis auf. Von insgesamt 27 Proben, die mit 30 E.coli pro 100 ml dotiert waren, ergaben nur 17 einen positiven ECA-Befund innerhalb 24 Stunden Inkubationszeit.

Wie nachfolgende Versuche im Labor der GEW Köln AG zeigten, lag die Ursache für die niedrige Wiederfindungsrate mit dem ECA-ELISA sehr wahrscheinlich in einer Wachstumshemmung durch den Phosphat-Borat-Acetat-Puffer, der vom NLGA zur Stabilisierung der Ringversuchsproben eingesetzt wird (siehe Punkt 3). Phosphat in höheren Konzentrationen wirkt vermutlich wegen seiner Fähigkeit, Calcium zu komplexieren, wachstumshemmend.

Auswertung des 2. Ringversuchs vom 29.4.1998

Die Notwendigkeit eines zweiten Ringversuchs folgte aus der Tatsache, daß beim ersten Ringversuch nicht alle der niedrig mit E. coli dotierten Proben im ECA-ELISA als positiv erkannt worden waren. Da als Ursache für die mangelnde Sensitivität eine Hemmwirkung des Phosphat-Borat-Acetat-Puffers auf das Bakterienwachstum angenommen wurde, erfolgte die Kultivierung in DEV-Lactose-Pepton-Bouillon nach Filtrierung der Proben. Bei dieser Vorgehensweise gelangt der Puffer nicht in das Anreicherungsmedium und Matrixeffekte werden vermieden.

An dem 2. Ringversuch nahmen 11 Laboratorien teil, wovon 10 Ergebnisse abgaben. Es gab drei verschiedene Probentypen, jedes Labor erhielt insgesamt 8 Proben in unterschiedlichen Kombinationen.

Tab. 3: Proben mit unterschiedlichen Dotierungen des Ringversuchs vom 29.04.1998

E.coli (Lactose-positiv)	ca. 30/100 ml
Klebsiella (Lactose-positiv)	ca. 50/100 ml
Serratia (Lactose-negativ)	ca. 130/100 ml

Tab. 4: Zusammenfassung der Ergebnisse des Ringversuchs vom 29.04.1998

Dotierung je 100 ml	Anzahl Labors	Anzahl Ergebnisse	ECA Anz. pos./Anteil pos.	ECA Anz. neg./Anteil neg.
E. coli 30	10	36	36 (100 %)	0 (0 %)
Klebsiella 50	10	24	24 (100 %)	0 (0 %)
Serratia 130	10	20	20 (100 %)	0 (0 %)

Alle Laboratorien ermittelten bei den Enterobacteriaceae-haltigen Proben einschließlich der niedrig dotierten E. coli-Proben innerhalb von 24 Stunden positive ECA-Befunde.

Anmerkung: Von einigen Teilnehmern des 2. Ringversuchs wurde bemängelt, daß es bei dem 2. Ringversuch keine Negativ-Proben gab. Dies beruhte auf einem Mißverständnis bei der Abstimmung und Organisation des Versuchs. Der Arbeitskreis sah darin aber keinen Anlaß für eine Wiederholung des Versuches, da bei der Durchführung eines ELISA in jedem Fall eine Negativ-Kontrolle mitgeführt wird.

3. Zusätzliche Untersuchungen zum Einfluß der Probenmatrix

Zur Abklärung eines möglichen Hemmung auf das Bakterienwachstum durch den zur Probenstabilisierung verwendeten Phosphat-Borat-Acetat-Puffer wurden im Labor der GEW Köln AG die Kinetik des Bakterienwachstum in Ansätzen mit und ohne Puffer untersucht.

3.1 Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung erfolgte am 14.12.1998. Für die Versuche stellte das NLGA dieselben Stämmen von E. coli und Klebsiella zur Verfügung, die auch in den

Ringversuchen eingesetzt worden waren. Zum Vergleich der Wachstumskinetiken wurden Ansätze mit 100 ml doppelt-konzentrierter DEV-Lactose-Pepton-Bouillon unter Zusatz von 100 ml Phosphat-Borat-Acetat-Puffer und Ansätze von 200 ml einfach-konzentrierter DEV-Lactose-Pepton-Bouillon durchgeführt. Für die Versuche wurden E. coli und Klebsiella jeweils mit einer Zelldichte von ca. 4×10^4 /ml inokuliert und über 8 Stunden bei 36 °C (ohne Schütteln) bebrütet. In Zeitabständen von 30 bzw, 60 Minuten wurden 1 ml-Aliquots steril entnommen und bis zur Untersuchung im ECA-ELISA bei -20 °C eingefroren. Die ECA-Untersuchung erfolgte am nächsten Tag.

3.2 Versuchsergebnisse

Die Verläufe des Bakterienwachstums von beiden Stämmen ließen deutlich erkennen, daß das Wachstum in den Ansätzen mit Puffer um ca. 2 Stunden verzögert statt fand (siehe Abb. 1 und 2). Diese Ergebnisse erlaubten den Rückschluß, daß die falsch-negativen ECA-Befunde, die beim 1. Ringversuch bei niedrig dotierten E. coli-Proben auftraten, ebenfalls auf eine Wachstumshemmung durch den Puffer zurückzuführen waren.

4. Darstellung der Ergebnisse der Ringversuche in der DIN 38411 K9

In seiner Sitzung am 12.01.1999 beschloß der UA8 adhoc 1 "Enterobacteriaceae", daß die Ergebnisse der Ringversuch in Form der nachfolgenden Tabellen einschließlich des erläuternden Textes in die DIN aufgenommen werden sollen.

Verfahrenskenndaten zur DIN 38411 K9

Die Ergebnisse wurden in zwei Ringversuchen am 29.10.1997 und 29.04.1998 ermittelt. Die Herstellung und Verteilung der dotierten Wasserproben erfolgte durch das Niedersächsische Landesgesundheitsamt.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Ringversuchs vom 29.10.1997

Dotierung je 100 ml	Anzahl Labors	Anzahl Ergebnisse	ECA	
			Anz. pos./Anteil pos.	Anz. neg./Anteil neg.
E. coli 60	9	27	27 (100 %)	0 (0 %)
Klebsiella 60	9	27	27 (100 %)	0 (0 %)
Proteus 100	9	27	27 (100 %)	0 (0 %)
Aeromonas 100	9	27	27 (100 %)	0 (0 %)
Blindwert (nicht dotiert)	9	9	0 (0 %)	9 (100 %)

Zusammenfassung der Ergebnisse des Ringversuchs vom 29.04.1998

Dotierung je 100 ml	Anzahl Labors	Anzahl Ergebnisse	ECA	
			Anz. pos./Anteil pos.	Anz. neg./Anteil neg.
E. coli 30	10	36	36 (100 %)	0 (0 %)
Klebsiella 50	10	24	24 (100 %)	0 (0 %)
Serratia 130	10	20	20 (100 %)	0 (0 %)

Abb. 2: ECA-Bildung von Klebsiella in Kulturen mit und ohne Phosphat-Borat-Acetat-Puffer

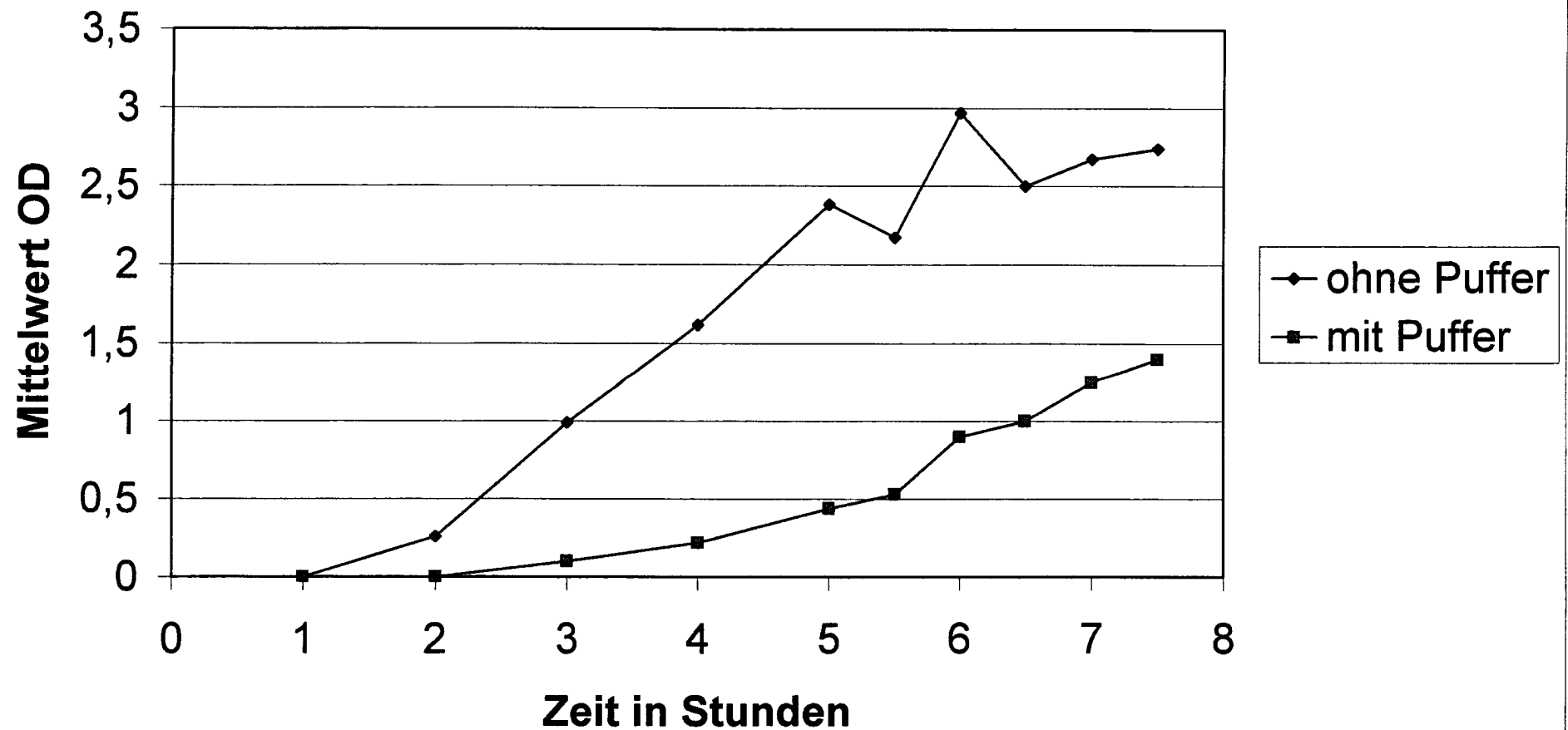


Abb. 1: ECA-Bildung von E.coli in Kulturen mit und ohne Phosphat-Borat-Acetat-Puffer

