

Pharma	Food	Kosmetik	Chemie
✓✓✓	✓✓	✓✓	
Planer	Betreiber	Einkäufer	Manager
	✓✓		

# FLOTTE ALTERNATIVE

**Mikrobiologische Schnellmethoden – wie gut sind sie?** Der Einsatz von automatisierten Schnellmethoden bekommt im Umfeld der analytischen Mikrobiologie einen immer höheren Stellenwert. Der größte Vorteil von mikrobiologischen Schnellmethoden ist die Geschwindigkeit, mit der Ergebnisse erzielt werden. Die Analysenzeit des Schnelltests beträgt rund 15 min. Die wichtigste Frage eines potentiellen Nutzers dieser Systeme ist: "Wie gut korreliert eine neue Schnellmethode mit meinen existierenden Nachweisverfahren?"

Der folgende Beitrag untersucht daher die Empfindlichkeit und Korrelation einer solchen Schnellmethode. Die typische Probenmatrix im Produktionsprozess der pharmazeutischen Industrie und Nahrungsmittelindustrie ist Reinstwasser (Aqua purificata). Ein vollautomatisiertes Durchflusszytometer bildet die zentrale Messeinheit der modernen mikrobiologischen Analytik. Als typischer Repräsentant der modernen mikrobiologischen Analytik wurde ein vollautomatisiertes Durchflusszytometer herangezogen.

Zielsetzung der Tests ist die Untersuchung von Genauigkeit bzw. Wiederholbarkeit der Keimzählraten in Reinst-

wasser bei Einsatz eines schnellen Durchflusszytometers im 20-Minuten-Takt. Zunächst soll die untere Nachweisgrenze des Instruments durch Bestimmen der Nullzählrate festgelegt werden. Anschließend sollen Proben einer validierten Reinstwasser-Anlage analysiert und mit Messergebnissen der klassischen Methoden verglichen werden.

## Schnellmethode und klassische Inkubation im Paralleltest

Alle Wasserproben wurden auf ein R2A-Nährmedium (Petrischale) aufgebracht. Dabei sind immer zwei Platten parallel inokuliert worden. Nach Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte das

### Autoren

Walter Braun, Key Account Manager mikrobiologische Analytik;

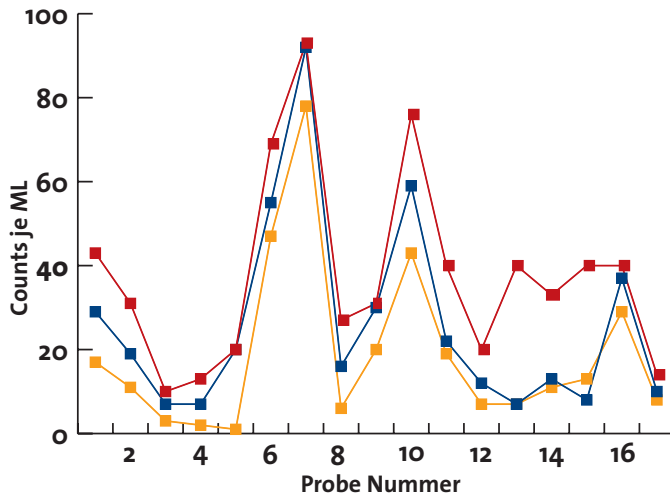
Jörg Dressler, Vorstand PMT



Durchflusszytometer Typ RBD 3000 von Advanced Analytical Technologies

Bild: Photocase.com

**Zytometerergebnisse und konventionelle Auszähl-  
ergebnisse der R2A-Platten für 17 Probenahmen**



Auszählen der Agarplatten nach fünf und zehn Tagen. Danach wurden jeweils zwei Zählergebnisse in einem Mittelwert zusammengefasst.

Parallel zur klassischen Keimzählung wurde die Schnellmethode mit Hilfe des Durchflusszytometer RBD 3000 angewendet. Das Zytometer wurde in einem 20-minütigen Analysetakt betrieben.

Alle relevanten Instrumentenparameter wurden vorab durch den Einsatz reiner Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Ralstonia pickettii* ATCC 49129, *Serratia marcescens* ATCC 13880, *Escherichia coli* ATCC 25922 und *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ermittelt bzw. eingestellt. Einer der wichtigsten Parameter war die Nullzählrate (Hintergrundzählrate) des automatischen Messgerätes. Diese wird naturgemäß ohne Referenzkeime ermittelt. Vielmehr wurden hierzu 96 Proben entionisierten Referenzwassers (auf 0,2 µm sterilfiltriert) im Zytometer analysiert.

**Mikrobiologische Schnellmethoden sind so gut wie eine klassische Inkubation**

Nach Vorabbestimmung der Hintergrundzählraten wurden Proben eines validierten Wassersystems (Culligan, 18 MΩ) genommen. Die Entnahmestelle wurde geöffnet und das Probewasser vor Probenahme eine Minute lang gespült. Die Proben wurden sukzessive im Zytometer analysiert, wobei jeweils zwei Messdurchgänge pro Probe durchgeführt und ein Mittelwert daraus gebildet wurde. Diese beiden Messdurchgänge wur-

den in einem Mittelwert weiterverarbeitet. Eine mit 0,2 µm filtrierte Probe (Wasser Hintergrund) wurde ebenfalls bei jedem Probensatz vermessen. Die Testreihe verlief stets mit unveränderter Instrumentierung.

**Die Auswertung zeigt nur einen Ausreißer bei der Zählrate**

Die Nullzählraten (Hintergrundzählraten) des sterilfiltrierten, entionisierten Wassers ergab eine mittlere Zählrate von  $2 \pm 2$  mit einem Gesamtintervall zwischen 0 und 8 Zählereignissen (pro 0,25 ml). Die Statistik beruht auf  $n = 96$  Messungen. Lediglich eine dieser Hintergrundproben wies die Zählrate 8 auf, während die restlichen 95 Proben zwischen 0 und 6 Zählereignisse (pro 0,25 ml) auswiesen. Unterschiedliche Vorbehandlung der Nullproben (Abfüllung der Proben in Hepa-Filterkabine, Entgasung der Wasserprobe) ergaben keine weitere Absenkung der Nullzählraten. Das System ist in der Lage, auch geringe Verunreinigungsmengen detektieren zu können, aber es ist notwendig, objektive Akzeptanzkriterien für den Zählhintergrund zu etablieren.

Nach der Analyse oben genannter 96 Nullproben wurden Nullzählraten  $\leq 6$  je 0,25 ml als akzeptabel bewertet. Bei Nullzählraten zwischen 7 und 8 müssen die Analyseproben wiederholt werden. Bei Nullzählraten  $\geq 9$  werden die Analyseergebnisse verworfen.

Bei der Vermessung des eigentlichen Probewassers in Reinstwasser-Qualität werden Zählraten zwischen 1 und 22 Counts – jeweils bezogen auf 0,25 ml Probevolumen – beobachtet. Siebzehn

**ENTSCHEIDER-FACTS**

**Für Anwender**

- Automatisierte Schnellmethoden bekommen in der analytischen Mikrobiologie einen immer höheren Stellenwert.
- Bei klassischen Inkubationsmethoden liegen die Ergebnisse sehr viel später vor als bei Schnellmethoden.
- Über die Gesamtheit des Tests stimmte die Trendlinie des Durchflusszytometers gut mit den Plattenzählraten überein.
- Bei Abweichungen liegen die Warnungen via Zytometer zehn Tage eher vor als bei der Standardmethode.
- Mikrobiologische Methoden zur Schnellanalyse sind eine schnelle und effektive Nachweismethode für mikrobiologische Verunreinigungen.
- Im Einsatzbereich Purified Water sind sie eine hocheffektive Ergänzung konventioneller Methoden.

Analyseergebnisse des Wassers – jede an einem anderen Produktionstag – sind in der Grafik dargestellt. Sie zeigt ebenfalls die Ergebnisse der klassischen Keimzahlbestimmung nach fünf und zehn Tagen Inkubation. Die Platten wurden erstmalig nach fünf Tagen ausgezählt, aber Keimwachstum wurde bis zu zehn Tage lang beobachtet. Die Grafik zeigt auch, dass die 10-Tage-Zählraten durchwegs höher liegen als die korrespondierenden 5-Tage-Zählraten.

**Mikrobiologische Methoden sind schnelle und gute Alternative**

Über die Gesamtheit der 17 Tests stimmt die Trendlinie des Durchflusszytometers in ihrem Verlauf gut mit den Plattenzählraten überein. Die durchgängig höheren Zählbefunde verglichen mit der konventionellen Plattenmethode beruhen auf dem Vermessen lebendiger Zellen der Wasserprobe, die anschließend auf den verwendeten Nährmedien keine Kulturen bilden.

Setzt man eine Warngrenze auf 50 cfu/ml fest, zeigt das Zytometer innerhalb seiner 20-minütigen Analysezeit ein Überschreiten bei der Messung 6, 7 und 10. Auch die 10-Tage-Zählraten generieren hier eine Warnung. Der Hauptunterschied liegt hier natürlich in dem Umstand, dass die Warnungen via Zytometermessung zehn Tage eher vorliegen als diejenigen der Standardmethode mit R2A-Platte. ■

**KONTAKT** [www.pharma-food.de](http://www.pharma-food.de)  
 Weitere Infos P+F 606