

Raad voor Accreditatie (RvA)

**Toelichtend document
microbiologie**

Documentcode:

RvA-T002-NL

Versie 3, 5-2-2016

Een RvA-Toelichting beschrijft het beleid en/of de werkwijze van de RvA met betrekking tot een specifiek accreditatieonderwerp. Indien het beleid en/of de werkwijze betreffende een accreditatieonderwerp, dat in een RvA-Toelichting is beschreven, in een EA, ILAC of IAF-document wordt vastgelegd, zal de RvA haar beleid en werkwijze in overeenstemming brengen met dit EA, ILAC of IAF-document.
Een actuele versie van de Toelichtingen is via de website van de RvA (www.rva.nl) te verkrijgen.

Inhoud

1	Inleiding	4
2	Validatie van microbiologische methoden	4
3	Meetonzekerheid	6
4	Toepassing van kwaliteitscontroles	6
5	Toepassing van de begrippen ‘conform’, ‘gelijkwaardig aan’ en ‘eigen methode’	8
6	Verrichtingenlijst	9
7	Rapportage	10
8	Belangrijke wijzigingen ten opzichte van de vorige versie	12
9	Literatuur	12
	Bijlage A Prestatiekenmerken	13

1 Inleiding

In dit document, opgesteld door de overleggroep vakdeskundigen microbiologie, is een aantal onderwerpen opgenomen die bij de beoordeling van microbiologische verrichtingen in de praktijk een belangrijke rol spelen en waarbij een nadere algemene toelichting nodig wordt geacht.

Deze onderwerpen zijn:

- validatie en meetonzekerheid van microbiologische methoden;
- toepassing van kwaliteitscontroles;
- toepassen van de begrippen ‘conform’, ‘gelijkwaardig aan’ en ‘eigen methode’;
- rapportage;
- verrichtingenlijst.

2 Validatie van microbiologische methoden

2.1 Inleiding

Analysemethoden die worden aangeboden voor accreditatie dienen gevalideerd te zijn. Voor de structuur van de methodevalidatie wordt verwezen naar NEN 7777:2012; Milieu en voedingsmiddelen – Prestatiekenmerken van meetmethoden. Deze norm is bedoeld voor de validatie van fysische en chemische methoden. De validatie van microbiologische methoden kan niet geheel op dezelfde wijze als in de chemie of de fysica worden uitgevoerd. Voor de validatie van microbiologische methoden voor onderzoek van levensmiddelen en diervoeders bestaat de NEN-EN-ISO 16140:2003 die bedoeld is voor de validatie van alternatieve (commerciële) methoden. Sinds 2007 is een werkgroep bezig met de herziening van deze norm. De opzet is om de norm ook uit te breiden naar andere vormen van validatie, zoals in-house-methoden en verificatie van normen en gevalideerde alternatieve methoden. Voor de validatie van onderzoek van water wordt verwezen naar NVN-ENV-ISO 13843:2001.

In dit hoofdstuk wordt ingegaan op enkele essentiële aandachtspunten die bij de validatie van microbiologische methoden een rol spelen.

Onder validatie wordt verstaan ‘dat aangetoond wordt dat de beschreven analysemethode geschikt is voor de beoogde toepassing’. Dat wil zeggen ‘voldoet aan de eisen die er met betrekking tot de toepassing aan gesteld worden’. De relevante prestatiekenmerken van de methode moeten worden vastgesteld, afhankelijk van de status en soort methode, en beoordeeld of deze voldoen aan het gebruiksdoel. Initiële validatie wordt uitgevoerd voordat de methode operationeel wordt toegepast.

Microbiologische methoden worden onderscheiden in:

- kwalitatieve methoden of grensreacties (aantonen van micro-organismen). Hierbij wordt nagegaan of een bepaalde soort of groep micro-organismen al dan niet aantoonbaar is in een gegeven hoeveelheid van het product.
- kwantitatieve methoden of tellingen (bepalen van het aantal micro-organismen). Hierbij wordt het aantal kolonievormende eenheden (kve) per ml of gram product bepaald volgens een MPN- of telplaattechniek.

2.2 Ingebruikneming referentiemethode ('conform'; zie RvA-T001)

Referentiemethoden (normen) worden op nationaal (NEN), Europees (EN) of mondiaal (ISO, IDF) niveau vastgesteld. Voor het onderzoek van voedingsmiddelen en diervoeders zijn op het ogenblik slechts een beperkt aantal referentiemethoden gevalideerd. De prestatiekenmerken van deze referentiemethoden zijn als bijlage aan de norm toegevoegd. Naar verwachting zullen in de komende jaren meer referentiemethoden worden gevalideerd, met name de methoden voor het onderzoek van levensmiddelen die in de Europese wetgeving worden vermeld. Voor een referentiemethode geldt dat geen volledige validatie vereist is. De volgende prestatiekenmerken moeten altijd per matrix door de gebruiker voor zijn eigen situatie worden vastgesteld:

- kwalitatieve methode: aantoonbaarheidsgrens;
- kwantitatieve methode: juistheid, herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid en meetonzekerheid.

In bijlage A staan aanwijzingen voor het vaststellen van de volgende prestatiekenmerken: juistheid, herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid en aantoonbaarheidsgrens.

Op welke wijze deze prestatiekenmerken bepaald kunnen worden is voor onderzoek van water bijvoorbeeld in meer details vastgelegd in KIWA rapport BTO 2001.166.

2.3 Ingebruikneming gewijzigde referentiemethode ('gelijkwaardig aan'; zie RvA-T001)

Onder een gewijzigde methode wordt verstaan een methode die reeds was gevalideerd (referentiemethode) maar waarin een verandering is aangebracht. Voor een gewijzigde methode is een hervalidatie nodig gericht op die prestatiekenmerken die redelijkerwijs door de verandering kunnen zijn beïnvloed.

2.4 Ingebruikneming van een eigen (klassieke) methode ('eigen methode'; zie RvA-T001)

Een eigen methode kan een methode zijn waarvoor nog geen referentiemethode is vastgesteld of het gebruik van een referentiemethode in een ander toepassingsgebied. Voor een eigen methode geldt dat een volledige validatie is vereist, tenzij de methode al door een onafhankelijke instantie is gevalideerd.

- Kwalitatieve methode: aantoonbaarheidsgrens, sensitiviteit, specificiteit en robuustheid.
- Kwantitatieve methode: juistheid, herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid, sensitiviteit, specificiteit, robuustheid en meetonzekerheid.

Bij de keuze van een eigen methode is aan te raden uit te gaan van methoden die al door een nationale of internationale organisatie aan een validatieonderzoek zijn onderworpen, zoals NMKL (Nordic Committee on Food Analysis, Oslo, Norway); AOAC International (Rockville, USA); IDF (International Dairy Federation, Brussels, Belgium). Daarnaast is het mogelijk te refereren aan branchegedragen methoden of breed gepubliceerde en toegepaste methoden. De relevante prestatiekenmerken zijn dan beschikbaar (zie ook document RvA-T001). De gebruiker hoeft dan geen volledige validatie meer uit te voeren, maar kan de werkwijze volgens paragraaf 2.2 volgen.

2.5 Ingebruikneming van een alternatieve (snelle) methode

Microbiologisch onderzoek kan met klassieke of alternatieve methoden worden uitgevoerd. Alternatieve methoden zijn meestal minder arbeidsintensief en de resultaten meestal sneller beschikbaar zoals bij immunologische, moleculair-biologische of instrumentele technieken. Voor de validatie van deze technieken en het vaststellen van de gelijkwaardigheid aan de referentiemethode is

NEN-EN-ISO 16140:2003 ontwikkeld. Onafhankelijke organisaties die de validatie van alternatieve microbiologische methoden volgens deze norm uitvoeren en de productie certificeren, zijn de Europese organisatie “MicroVal” (www.microval.org), en de Franse organisatie AFAQ AFNOR CERTIFICATION (www.afnor-validation.com). AOAC International (www.aoac.org) in de Verenigde Staten valideert alternatieve methoden volgens haar eigen AOAC richtlijnen. De Scandinavische organisatie NordVal (www.nmkl.org/index.php/nb/nordval) valideert ook alternatieve methoden volgens ISO 16140, maar certificeert de alternatieve methoden niet zoals § 4.2 van de ISO 16140 voorschrijft.

De gebruiker van een alternatieve methode gevalideerd door bovengenoemde organisaties kan de werkwijze volgens paragraaf 2.2 volgen.

3 Meetonzekerheid

Voor de bepaling van de meetonzekerheid van microbiologische verrichtingen op het gebied van voedingsmiddelen, diervoeders en omgevingsmonsters wordt verwezen naar NPR-ISO/TS 19036:2006, Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders – Richtlijnen voor de schatting van meetonzekerheid voor kwantitatieve bepalingen. Deze norm is toepasbaar voor de kwantitatieve (tellingen) en onder bepaalde omstandigheden voor semi-kwantitatieve (MPN) microbiologische verrichtingen. Voor de bepaling van de meetonzekerheid van microbiologische watermethoden wordt verwezen naar ISO 29201:2012.

De schatting van de meetonzekerheid wordt verkregen door onderzoek onder binnenlaboratorium-reproduceerbaarheidscondities uit te voeren. Binnen de microbiologie is het nog niet mogelijk of zinvol de meetonzekerheid van kwalitatieve verrichtingen te bepalen.

4 Toepassing van kwaliteitscontroles

In NEN-EN-ISO/IEC 17025 wordt aangegeven dat het laboratorium de kwaliteit van de resultaten borgt door het uitvoeren en beoordelen van diverse kwaliteitscontroles.

Voor het vakgebied microbiologie is het gebruik van de juiste kwaliteitscontroles bijzonder belangrijk omdat de vertaling van de prestatiekenmerken naar de microbiologische bepaling niet altijd, mede afhankelijk van de matrix, zonder meer mogelijk is. De begrippen juistheid en precisie bijvoorbeeld laten zich veel moeilijker omschrijven (en dus bepalen) voor microbiologische analyses dan voor bijvoorbeeld analytisch-chemisch onderzoek. Bij microbiologische verrichtingen is het wel mogelijk om aan de hand van controles de technische beheersbaarheid van de methode aan te tonen. Goede referentiemonsters die de representativiteit van de methode in bepaalde producten weerspiegelen, zijn echter nog niet in alle gevallen voorhanden.

Kwaliteitscontroles kunnen op diverse manieren worden toegepast. Hierna is de interne en externe kwaliteitsborging weergegeven als eerste-, tweede- en derdelijnscontrole.

- Eerstelijnscontrole: controle van de verrichting door de uitvoerende zelf.
- Tweedelijnscontrole: controle onafhankelijk van de uitvoerenden.

- Derdelijnscontrole: onafhankelijke externe controle (zogenaamde proficiency tests of eventuele andere ringonderzoeken of interlaboratoriumonderzoeken die een beoordeling geven van de prestaties van het deelnemend laboratorium).

Als basis voor de uitvoering van de genoemde lijncontroles kunnen NEN-EN-ISO 8199:2007 (voor watermicrobiologie) en NEN-EN-ISO 7218:2007 (levensmiddelenmicrobiologie) dienen.

Ten aanzien van kwaliteitscontroles wordt bovendien verwezen naar paragraaf 5.9 over de waarborging van de kwaliteit van de beproevings- en kalibratieresultaten in NEN-EN-ISO/IEC 17025.

Minimaal zal een laboratorium naast de eerstelijnscontrole een tweede- of derdelijnscontrole operationeel dienen te hebben. Waar mogelijk wordt verwacht dat men deelneemt aan een derdelijnscontrole.

4.1 Eerstelijnscontrole

In het kader van een goede borging van het proces is het noodzakelijk om per meetserie (dagelijks) een blanco en positief controlemonster mee te nemen. De eerstelijnscontrole dient alle stappen van het analyseproces te omvatten. Eerstelijnscontroles kunnen de volgende parameters omvatten

Blanco monsters: Blanco monsters, zoals een steriel proefmonster, geven informatie over de steriliteit van de gebruikte media en hulpmaterialen en het aseptisch uitvoeren van alle handelingen. In principe mag geen groei optreden. Afhankelijk van het doel van de bepaling kan echter een geringe besmetting toelaatbaar zijn, waarvoor specifieke criteria moeten worden opgesteld.

Positieve controle: Een positieve controle is van belang om aan te tonen dat de analyse goed is uitgevoerd. Bij tellingen dient men gebruik te maken van een kwantitatief controlemonster en dient men de waarnemingen te interpreteren met behulp van controlekaarten. In de NEN 6603:2010 wordt het gebruik van controlekaarten, naast voor chemische analyses, ook voor de uitvoering van microbiologische analyses beschreven.

Bij kwalitatieve verrichtingen zoals grensreacties dient het besmettingsniveau van het controlemonster representatief te zijn voor de aantoonbaarheidsgrens. Bij een gemiddeld besmettingsniveau van 5 kve per controlemonster is de kans op het inzetten van een toevalligwijds onbesmet (negatief) monster volgens de Poisson spreiding kleiner dan 1%. Alle waarnemingen van positieve controles moeten worden bijgehouden en waar relevant statistisch verwerkt. Om de kritische stappen in het proces te kunnen beoordelen is het van belang om de invloed van het monstermateriaal (matrix) mee te nemen. Gezien de mogelijke grote diversiteit in de samenstelling van de te onderzoeken matrices zal hierbij gekozen moeten worden voor een matrix die representatief is voor het monsteraanbod bij het laboratorium. Per meetserie wordt aan een (willekeurig gekozen of vaste) matrix de positieve controlestam op laag niveau (aantoonbaarheidsgrens) toegevoegd.

Negatieve controle: Het gebruik van negatieve controles is met name van belang voor de kwaliteitscontrole of ingangcontrole van cultuurmedia met betrekking tot de selectiviteit en de incubatietemperatuur. Wanneer de controle van de gebruikte media bij de bereiding door het laboratorium (of leverancier van de media?) wordt uitgevoerd, kan daarop de negatieve controle bij de uitvoering van het onderzoek achterwege blijven.

Bij bevestigingsreacties en determinaties kan het gebruik van een negatieve controle naast een positieve controle van belang zijn voor een goede aflezing van de reacties.

Meervoudige waarnemingen: In een norm staat dikwijls voorgeschreven dat per verdunning één of meer platen moeten worden gebruikt. Bijvoorbeeld bij membraanfiltratie één plaat, bij gietplaten twee platen en bij strijkplaten drie platen. Hierbij dienen criteria voor de toegelaten spreiding te zijn vastgesteld. In de NEN-EN-ISO 7218 voor voedingsmiddelen en diervoeders is vastgelegd dat in tegenstelling tot de norm het gebruik van één plaat per verdunning is toegestaan, mits minimaal twee opeenvolgende verdunningen zijn ingezet. Indien slechts één verdunning wordt gebruikt (bijvoorbeeld in het geval van de telling van lage aantallen *Listeria monocytogenes*) dan worden twee platen per verdunning gebruikt.

4.2 Tweedelijnscontrole

Indien geen derdelijnscontrole mogelijk is wordt een tweedelijnscontrole verlangd. De tweedelijnscontrole dient onafhankelijk te zijn van de uitvoerenden. Waar relevant en mogelijk dient hierbij ook een toetsing op niveau te zijn ingevoerd waarbij grenzen vooraf worden vastgesteld en bewaakt. Hierbij kan bijvoorbeeld gebruik worden gemaakt van referentiematerialen, geaddeerde matrices, splitsing van monsters of herhaling van onderzoek bij kwalitatieve monsters.

4.3 Derdelijnscontrole

Onder derdelijnscontrole wordt verstaan: de deelname aan proficiency testen (ringonderzoeken, interlaboratoriumonderzoeken) bedoeld om de prestatie van de deelnemende laboratoria te beoordelen. Het doel is om een directe toetsing te krijgen van de eigen performance in vergelijking met die van andere laboratoria. Het is dus additioneel op de interne kwaliteitscontrole en kan opgevat worden als niveaucontrole (zie bijlage A, juistheid). Bij de beoordeling van resultaten van ringonderzoeken is het van belang om niet alleen naar de afzonderlijke scores te kijken, maar de resultaten moeten volgens NEN-EN-ISO/IEC 17025 (paragraaf 5.9) zo worden vastgelegd dat ook trends (prestaties in de tijd) worden opgemerkt. De trendanalyse kan met name gebruikt worden voor een goede inschatting van de juistheid van de methode.

In Nederland is het nu mogelijk aan verschillende soorten microbiologische proficiency testen deel te nemen, bijvoorbeeld op het gebied van diervoeders, zuivel, (drink)water en voedingsmiddelen. Buitenlandse organisaties die proficiency testen organiseren voor verschillende micro-organismen en matrices, zijn ook actief op de Nederlandse markt. Bij de keuze van de organisatie dient er niet alleen op gelet te worden dat de organisatie een ISO/IEC 17043-accreditatie heeft voor het verzorgen van proficiency testen, maar ook op de opzet van de ringonderzoeken zoals het aantal negatieve en positieve monsters (met name voor de kwalitatieve methoden), de representativiteit van het besmettingsniveau en de juiste matrix.

5 Toepassing van de begrippen ‘conform’, ‘gelijkwaardig aan’ en ‘eigen methode’

In het kader van een eenduidige toepassing van de begrippen conform, gelijkwaardig aan en eigen methode in de verrichtingenlijsten (zie document RvA-T001) zijn de volgende voorbeelden opgesteld.

Deze opsomming is uiteraard niet volledig maar geeft een handvat bij het opstellen van de verrichtingenlijst. Ten aanzien van het aantoonbaar gevalideerd zijn van de afwijkende werkwijze(n) gelden de daarvoor van toepassing zijnde RvA-documenten en andere in dit toelichtend document genoemde referenties.

Referentiemethoden zijn veelal opgesteld voor een bepaalde matrix. Laboratoria kunnen geen conformiteit of gelijkwaardigheid claimen voor matrices afwijkend van de matrix die in de desbetreffende norm is opgenomen. Het is de verantwoordelijkheid van de branche zelf om ervoor te zorgen dat referentiemethoden worden opgesteld voor, of uitgebreid worden met, andere matrices.

“Conform”-verwijzing mogelijk bij:

- niet essentiële afwijkingen in de receptuur en/of bereiding van media ten opzichte van de in de norm genoemde mogelijkheid.

“Gelijkwaardig aan”-verwijzing mogelijk (na validatie) bij:

- gebruik van andere of snelle bevestigingstechnieken (diagnostische kits);
- het hanteren van andere telgrenzen;
- het hanteren van een andere telwijze en/of berekeningswijze;
- het gebruik van een andere primaire verdunningsreeks, mits uiteraard aangetoond dat deze afwijking geen invloed heeft op de uitkomst;
- alternatieve detectie- en bepalingstechnieken, gevalideerd volgens NEN-EN-ISO 16140:2003;
- één plaat per verdunning zonder een opeenvolgende verdunning toe te passen.

“Eigen methode” o.a. bij (alles wat niet geclaimd wordt als zijnde conform of gelijkwaardig):

- het gebruik van één ophopingmedium en/of isolatiemedium, terwijl in de norm twee media zijn voorgeschreven;
- het gebruik van een ander(e) incubatietraject, -duur, -temperatuur;
- het bevestigen van minder dan in de norm voorgeschreven aantal kolonies;
- onderzoek in een andere matrix;
- het toepassen van een andere monstergrootte dan in de norm vastgelegd.

6 Verrichtingenlijst

Zoals in RvA-T025 wordt aangegeven, dient in de titel van de verrichtingenlijst zoveel mogelijk essentiële informatie vermeld te worden. Hierbij wordt zoveel mogelijk de titel van het referentiedocument gebruikt, gevolgd door de gebruikte techniek (Real-time PCR, immunologie, ATP, etc.) of methode (grensreactie, telplaat, MPN techniek, membraanfiltratie, etc.). Voor microbiologische bepalingen kan de vermelding van het medium en de incubatietemperatuur ook van belang zijn.

In het kader van de EU-wetgeving (Verordening (EG) Nr. 2073/2005) kan het voor de opdrachtgever van belang zijn om te weten dat de gelijkwaardigheid gebaseerd is op de NEN-EN-ISO 16140. Deze gelijkwaardigheid kan in de scope aangegeven worden door het AFNOR- of MicroVal-certificaatnummer te vermelden.

Voorbeeld verrichtingenlijst

Nr.	Materiaal of product	Verrichting/Onderzoeksmethode	Intern referentienummer
Microbiologische analyses			
1	Pluimveemest	Het aantonen van Salmonella; grensreactie; MSRV	SOP 14 conform NEN-EN-ISO 6579:2002/A1:2007 Annex D
2	Voedingsmiddelen	Het bepalen van het aantal Enterobacteriaceae bij 30°C; telplaat, VRBG	SOP 10 gelijkwaardig aan NEN-ISO 21528-2
3	Diervoeders	Het aantonen van Salmonella; grensreactie; Real-time PCR	SOP 21 gelijkwaardig aan NEN-EN-ISO 6579 (AFNOR BRD 07/06-07/04)
4	Melk en zuivelproducten	Het bepalen van het algemeen kiemgetal bij 30°C; telplaat	ANAL-1321 Gelijkwaardig aan ISO 4833 (MV 0703-001LR)
5	Leiding- en constructiematerialen	Het bepalen van het koloniegetal bij 25°C; strijkplaat, R ₂ A-agar	LMB 010 eigen methode
6	Voedingsmiddelen	Het bepalen van coagulase positieve staphylococcen bij 37°C; telplaat, RPF-agar	A-RSV 5 conform NEN-EN-ISO 6888-2

7 Rapportage

7.1 Bevestiging van klassieke methoden

In microbiologische normen wordt voorgeschreven dat verdachte kolonies na isolatie op een selectieve voedingsbodem verder bevestigd moeten worden. Niet in alle gevallen is een opdrachtgever geïnteresseerd in zo'n nadere bevestiging, mede gezien de extra kosten. Blijft de waarde onder een norm (of criterium) of heeft het onderzoek betrekking op een trendanalyse, dan hoeft een bevestiging voor de opdrachtgever geen extra informatie op te leveren.

Bij de rapportage dient echter altijd vermeld te worden wanneer een bevestiging is weggelaten en een numerieke waarde wordt vermeld. Dit om te voorkomen dat een onjuiste uitslag wordt gerapporteerd.

Voorbeeld: norm voor Enterobacteriaceae < 100 kve/g. Op de plaat worden voor een onverdund monster 75 verdachte kolonies geteld. Rapportage kan zijn: < 100 kve/g of 75 kve/g (* zonder bevestiging)*

7.2 Bevestiging van alternatieve methoden

De organisaties die zich bezighouden met de validatie van alternatieve methoden gaan verschillend om met de eisen die aan de bevestiging worden gesteld. Er zijn alternatieve methoden, zoals bepaalde immunologische technieken, waarbij een bevestiging een integraal onderdeel van de

methode uitmaakt. Bij andere methoden zoals de PCR, wordt het aantonen van het doeleiwit als voldoende geacht.

AFNOR CERTIFICATION is tegenwoordig van mening dat in het geval van pathogenen zoals Salmonella, Listeria en E. coli O157 als extra zekerheid altijd een bevestiging moet worden uitgevoerd. Deze bevestiging kan de klassieke test uit een norm zijn, een alternatieve bevestigingstest of een alternatieve methode die op een ander principe berust.

Om de rapportage van alternatieve methoden objectief te houden, zoals in NEN-EN-ISO/IEC 17025 wordt voorgeschreven, moet het analyserapport/-certificaat altijd de volgende informatie bevatten:

- het principe van de alternatieve methode (immunologisch, PCR, etc.);
- de bevestigingstechniek (biochemisch, serologisch, norm, DNA-probe, diagnostische kit, etc.).

Bovengenoemde wijze van rapportage biedt ook de mogelijkheid zo'n bevestiging achterwege te laten. Afhankelijk van het doel van het onderzoek hoeft de extra zekerheid voor een opdrachtgever niet altijd relevant te zijn. Wanneer de aanvullende bevestiging in de validatie is opgenomen en deze bij de uitvoering van het onderzoek wordt weggelaten, dient deze afwijking op/in het analysecertificaat/-rapport vermeld te worden.

7.3 Rapportage van lage aantallen

In NEN-EN-ISO 7218 (levensmiddelen en diervoeders) en NEN-EN-ISO 8199 (water) zijn aanwijzingen te vinden over de rapportage van kiemgetallen die gebaseerd zijn op het aantal kolonies beneden de ondergrens van het telgebied. Bijvoorbeeld in het geval van gietplaten is de onderste telgrens gesteld op 10 kolonies per plaat. Dit heeft te maken met het statistische gegeven dat bij lage aantallen de nauwkeurigheid van de bepaling snel afneemt.

Bij kiemgetallen die gebaseerd zijn op tellingen beneden de 10 kolonies per plaat wordt voorgeschreven om het kiemgetal te rapporteren met de vermelding "indicatief" of "geschat", gezien de grote onnauwkeurigheid. Een andere optie is om de uitslag te rapporteren als < 100 kve per gram bij vaste producten of < 10 kve per ml bij vloeistoffen.

In NEN-EN-ISO 7218 wordt bij zeer lage aantallen (1- 3 kolonies per plaat) voorgeschreven en in NEN-EN-ISO 8199 geadviseerd om geen getal meer te rapporteren, maar < 40 kve/g bij vaste producten en < 4 kve/ml bij vloeistoffen met de vermelding "micro-organismen zijn aanwezig maar kleiner dan bovengenoemde waarde.

Bovengenoemde wijze van rapportage kan voor bepaalde opdrachtgevers problematisch zijn, bijvoorbeeld bij het grafisch weergeven van trendanalyses of bij het uitvoeren van berekeningen. ISO/IEC 17025 geeft de laboratoria echter op grond van § 5.10.3 de mogelijkheid om specifieke afspraken met de opdrachtgever te maken over de rapportage, zodat ook 1 tot 3 kolonies als indicatief gerapporteerd kunnen worden.

8 Belangrijke wijzigingen ten opzichte van de vorige versie

Ten opzichte van versie 2 is dit document gewijzigd op de volgende onderdelen:

- verwijzing voor water naar de norm voor meetonzekerheid ISO 29201 (§ 3 en 9);
- meenemen matrixeffect bij kwalitatieve positieve controle (§ 4.1);
- aanpassing van literatuur (§ 9);
- aanpassingen bijlage A (matrix, aantoonbaarheidsgrens en reproduceerbaarheid).

9 Literatuur

- Journal of AOAC International, vol.82, no.2, 1999, page 402-415; AOAC International Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation.
- KIWA-rapport BTO 2001.166; Vaststellen relevante prestatiekenmerken microbiologische referentiemethoden voor water. Oktober 2001. Nieuwegein.
- NEN 6603: 2010; Milieu en voedingsmiddelen – Eerstelijnscontrole met controlekaarten voor chemische en microbiologische analyses.
- NEN 7777: 2011/C1:2012 , Milieu en voedingsmiddelen; Prestatiekenmerken voor meetmethoden.
- NEN-EN-ISO 7218: 2007; A1:2014-04 Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
- NEN-ISO 8199: 2006; Water quality –General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture.
- NEN-EN-ISO 16140: 2003 / A1:2009; Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods.
- NEN-EN-ISO/IEC 17025; Algemene eisen voor de competentie van beproevings- en kalibratielaboratoria.
- NEN-EN-ISO 17994: 2014; Water quality – Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods
- NPR-ISO/TS 19036: 2006; Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.
- NPR 6268 :2012; Water. Algemene principes bij kwaliteitsborging van bacteriologisch onderzoek van water.
- NVN-ENV-ISO 13843: 2001; Water; Leidraad voor de validatie van microbiologische methoden.
- ISO 29201:2012; Water - Variabiliteit van testresultaten en de meetonzekerheid van microbiologische telmethoden.
- RvA-T001; Toepassen van de begrippen conform, gelijkwaardig aan en eigen methode.

Bijlage A Prestatiekenmerken

Richtlijn voor het vaststellen van relevante prestatiekenmerken in eigen situatie (beperkte validatie ofwel verificatie) voor microbiologische referentiemethoden.

Matrix

De relevante prestatiekenmerken zijn gerelateerd aan de matrix. Bij de keuze van commerciële methoden die volgens NEN-EN-ISO 16140 door een onafhankelijke organisatie zijn gevalideerd, is het belangrijk om na te gaan of de matrices die voor het laboratorium van belang zijn in de validatie zijn meegenomen. Niet alle commerciële methoden zijn voor het hele toepassingsgebied van de norm gevalideerd.

Bij de verificatie moet het laboratorium de relevante prestatiekenmerken in de eigen situatie, zoals aantoonbaarheidsgrens, juistheid, herhaalbaarheid, binnenlaboratoriumreproduceerbaarheid en meetonzekerheid experimenteel vaststellen. De prestatiekenmerken zijn afhankelijk van het toepassingsgebied (matrix) van de methode. Bij de microbiologie wordt het matrixeffect bepaald door de productsamenstelling, de aanwezige begeleidingsflora en de stresssituatie van het micro-organisme die door de behandeling van het product is veroorzaakt (drogen, verhitten, koelen, vriezen, etc.). Bij de keuze van de verschillende matrices dient hiermee rekening gehouden te worden.

Voedingsmiddelen en diervoeders

In analogie met de NEN-EN-ISO 16140 is het voor voedingsmiddelen gebruikelijk geworden om in plaats van 'matrix' te praten over 'categorie, type en product' (item). Onder categorie wordt een groep van voedingsmiddelen of producten verstaan die wat betreft samenstelling en gebruik vergelijkbaar zijn. Het type geeft de procesbehandeling weer, zoals onbehandeld (rauw, vers), verhit, droog, ingevroren, etc. Onder product wordt het voedingsmiddel zoals gehakt, salami, kaas, etc. verstaan. De opzet is om per relevante categorie één product te kiezen voor het vaststellen van de relevante prestatiekenmerken. Bij meerdere relevante categorieën is het wenselijk om steeds een product uit een ander type te kiezen om het effect van de behandeling mee te nemen.

Aantal matrices: Omdat het om verificatie gaat is het niet nodig om de prestatiekenmerken voor alle voor het laboratorium relevante categorieën vast te stellen, hetgeen ook praktisch niet uitvoerbaar is. Afhankelijk van de diversiteit in matrices wordt voorgesteld om de verificatie voor één product uit drie tot vijf verschillende matrices (categorieën) bij een horizontale methode uit te voeren. Bij de keuze van deze producten is het belangrijk om moeilijke of kritische producten te kiezen met mogelijke matrixeffecten zoals veel stoorflora, remmende componenten, etc.

Bij kwantitatieve methoden dient bij de keuze van de drie tot vijf matrices ook naar de mogelijkheid gekeken te worden om de prestatiekenmerken in een natuurlijk besmet product te bepalen. In het geval van het algemeen kiemgetal, Enterobacteriaceae, gisten, coliformen en melkzuurbacteriën zijn zeker natuurlijk besmette grondstoffen of producten voorhanden.

Water

Onder het toepassingsgebied van water vallen verschillende soorten water zoals drinkwater, zwembadwater, oppervlaktewater, grondwater, regenwater, proceswater, koelwater, bronwater en afvalwater. De vraag die bij de verificatie van een microbiologische watermethode steeds gesteld

wordt of het nodig is om voor iedere soort water apart de prestatiekenmerken te bepalen. In analogie met de voedingsmiddelen wordt de volgende indeling in categorieën voorgesteld.

Categorie	Soort
Water voor menselijke consumptie	Drinkwater, bronwater, schoon proceswater, flessenwater, regenwater
Licht vervuild water	Oppervlaktewater, proceswater, grondwater
Sterk vervuild water	Afvalwater
Behandeld water; aanwezigheid remmende of afdodende verbindingen	Zwembadwater (chloor), koeltorenwater (biocide)

Aantoonbaarheidsgrens

Bij kwalitatieve bepalingen is de aantoonbaarheidsgrens moeilijk exact vast te stellen. Theoretisch kan de aanwezigheid van één kolonievormende eenheid in een gekozen hoeveelheid monstermateriaal (testportie) bepaald worden, bijvoorbeeld de aanwezigheid/afwezigheid van *Salmonella* in 25 g. Door de mate van sublethale beschadiging van het gezochte organisme, de aanwezige stoorflora en andere matrix-invloeden is dit niet altijd het geval.

Het vaststellen van de aantoonbaarheidsgrens in een bepaalde matrix wordt gedaan door het kunstmatig besmetten van testporties van een matrix. Voor het besmetten kan gebruik worden gemaakt van (gecertificeerde) referentiematerialen of van een verdunningsreeks van een opgekweekte stam. Het heeft de voorkeur om gebruik te maken van (gecertificeerde) referentiematerialen omdat deze een zekere mate van sublethale beschadiging hebben.

Om de aantoonbaarheidsgrens te bepalen zullen meerdere verdunningen van een referentiemateriaal of verdunde cultuur moeten worden ingezet. Afhankelijk van het niveau van het referentiemateriaal zal een kleine of grotere verdunning moeten worden toegepast.

Omdat van te voren niet exact bekend is hoeveel organismen in een bepaalde verdunning aanwezig zijn zullen meerdere verdunningen gebruikt moeten worden, die naar verwachting tussen de 0, 2, 4, 6 kve bevatten. Theoretisch worden bij een gemiddeld besmettingsniveau van 0,7 kve per monster 50 % van de monsters positief gevonden. De aantoonbaarheidsgrens is dan het niveau waarop ca. 50% van de monsters positief worden bevonden. Bij gebruikmaking van (gecertificeerd) referentiemateriaal met een laag besmettingsniveau kan het aantal verdunningen dat wordt ingezet worden beperkt (bijvoorbeeld tot 2) en kan het niveau dat op het certificaat is vermeld gebruikt worden als richtlijn voor het maken van verdunningen.

Bij het gebruik maken van een verdunningsreeks van een opgekweekte stam (of een (gecertificeerd) referentiemateriaal op hoog niveau (ca 10⁴) zullen, omdat van te voren niet exact bekend is hoeveel organismen in een bepaalde verdunning aanwezig, meerdere verdunningen gebruikt moeten worden die naar verwachting tussen de 0, 2, 4, 6 kve bevatten. Van elke gebruikte verdunning zal in veelvoud gecontroleerd moeten worden door het uitplaten op een niet selectief medium wat het niveau en de spreiding hierin is.

Juistheid

De juistheid van een microbiologisch bepaling is nooit exact te bepalen. De juistheid kan benaderd worden door met meerdere laboratoria onderzoek uit te voeren en het groepsgemiddelde (mediaan) te hanteren.

De juistheid voor de eigen situatie kan bepaald worden:

- aan de hand van proficiency testen (derdelijnscontrole)
- door gebruik van microbiologisch (gecertificeerd) referentiemateriaal;
- door gebruik van kunstmatig besmette monsters (terugvinding).

De voorkeur gaat uit naar een proficiency test. Bij een kwantitatieve methode dient de behaalde z-score ≤ 2 of ≥ -2 te zijn.

Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid kan worden bepaald door identieke monsters in één meetserie (reeks) te onderzoeken of aan de hand van duplo-bepalingen van monsters onder herhaalbaarheidsomstandigheden. Herhaalbaarheid wordt bij de methodevalidatie vastgesteld. Bij de toetsing kan alleen worden gesproken over herhaalbaarheid, wanneer de analyses standaard in meervoud worden uitgevoerd. In een norm zijn soms criteria voor de maximaal toegestane spreiding te vinden. De spreiding is afhankelijk van het aantal micro-organismen en de matrix.

Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid die in officiële validatierapporten genoemd staat is meestal bepaald aan de hand van een interlaboratoriumonderzoek dat is uitgevoerd conform ISO 5725. Het laboratorium kan voor de eigen situatie, in plaats van de reproduceerbaarheid, de binnenlaboratorium-reproduceerbaarheid bepalen. De werkwijze hiervoor staat beschreven in NPR-ISO/TS 19036. Het verdient de voorkeur om zowel de herhaalbaarheid als de reproduceerbaarheid (en daarmee ook de meetonzekerheid) in één onderzoek te bepalen. Hierdoor worden deze prestatiekenmerken voor dezelfde soort monsters bepaald en zijn deze beter vergelijkbaar. Van de twee analisten dient één analist voor de bepaling van de herhaalbaarheid de monsters in duplo in te zetten (twee deelmonsters afwegen), waaruit met dezelfde formule de herhaalbaarheid berekend kan worden.

Meetonzekerheid

Het vaststellen van de meetonzekerheid staat beschreven in NPR-ISO/TS 19036 en ISO 29201:2012..