

Raad voor Accreditatie (RvA)

**Toelichtend document
microbiologie**

Documentcode:

RvA-T002-NL

Versie 4.0, 29-09-2020

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 en verificatie van microbiologische methoden	4
2.1	Inleiding	4
2.2	Ingebruikneming referentiemethode ('conform'; zie RvA-T001)	5
2.3	Ingebruikneming gewijzigde referentiemethode ('gelijkwaardig aan'; zie RvA-T001)	6
2.4	Ingebruikneming van een eigen (klassieke) methode ('eigen methode'; zie RvA-T001)	6
2.5	Ingebruikneming van een alternatieve (snelle) methode	7
3	Meetonzekerheid	7
4	Toepassing van kwaliteitscontroles	8
4.1	Eerstelijnscontrole	8
4.2	Tweedelijnscontrole	10
4.3	Derdelijnscontrole	10
5	Toepassing van de begrippen 'conform', 'gelijkwaardig aan' en 'eigen methode'	10
6	Verrichtingenlijst (scope van accreditatie)	11
7	Rapportage	13
7.1	Bevestiging van klassieke methoden	13
7.2	Rapportage van lage aantallen	13
8	STEC	13
9	Belangrijke wijzigingen ten opzichte van de vorige versie	14
10	Literatuur	15
	Bijlage A: Prestatiekenmerken voor microbiologisch onderzoek van de voedselketen	16
	Bijlage B: Prestatiekenmerken voor microbiologisch onderzoek van water	19
	Bijlage C: Richtlijn voor de werkwijze voor het onderzoek, rapportage en scope vermelding voor het bepalen van STEC (Shiga-toxine producerende E. coli)	21

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, verificatie en meetonzekerheid van microbiologische methoden ([hoofdstuk 2](#) en [3](#));
- toepassing van kwaliteitscontroles ([hoofdstuk 4](#));
- toepassing van de begrippen ‘conform’, ‘gelijkwaardig aan’ en ‘eigen methode’ ([hoofdstuk 5](#));
- verrichtingenlijst ((scope van accreditatie), [hoofdstuk 6](#));
- rapportage ([hoofdstuk 7](#));
- richtlijn voor STEC ([hoofdstuk 8](#) en [bijlage C](#)).

2 Validatie en verificatie van microbiologische methoden

2.1 Inleiding

Binnen het werkveld van microbiologie worden verschillende technieken toegepast. De klassieke analysemethode is de kweekmethode die meestal wordt toegepast voor de referentiemethoden (ISO/CEN/NEN normen). Een andere veelvoorkomende techniek is de moleculaire techniek, zoals PCR. Deze moleculaire technieken worden vaak gebruikt voor ‘alternatieve methoden’ die commercieel verkrijgbaar zijn en vaak zijn gevalideerd ten opzichte van de referentiemethode. Analysemethoden die worden aangeboden voor accreditatie dienen gevalideerd of geverifieerd te zijn. Een verificatie is van toepassing wanneer het laboratorium gebruik wil gaan maken van een referentiemethode of een gevalideerde alternatieve methode. Een validatie is van toepassing wanneer het laboratorium gebruik wil gaan maken van een eigen methode.

In dit hoofdstuk wordt ingegaan op enkele essentiële aandachtspunten die bij de validatie en verificatie 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 soort methode, en er moet worden beoordeeld of deze voldoen aan het gebruiksdoel. Een validatie wordt uitgevoerd voordat de methode operationeel wordt toegepast.

Onder verificatie wordt verstaan dat het laboratorium kan aantonen dat een referentiemethode of een elders, door onafhankelijke organisatie gevalideerde alternatieve methode, in de eigen situatie goed toegepast kan worden. Hiertoe wordt een beperkt aantal prestatiekenmerken bepaald en indien mogelijk getoetst aan de prestatiekenmerken die in de norm staan.

Voor de validatie en verificatie van een microbiologische watermethode is de NEN-EN-ISO 13843:2017 ontwikkeld. In deze norm staan eisen voor het bepalen van prestatiekenmerken voor kwantitatieve microbiologische watermethoden (met name voor kweekmethoden).

Relevante normen voor het toepassingsgebied van de microbiologie van de voedselketen zijn:

- NEN-EN-ISO 16140-1:2016 Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden – Deel 1: Woordenlijst.
- NEN-EN-ISO 16140-2:2016 Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden - Deel 2: Protocol voor de validatie van alternatieve (eigendomsrechtelijke) methoden tegen een referentiemethode.
- NEN-EN-ISO 16140-3:2020 Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden – Deel 3: Protocol voor de verificatie van referentiemethoden en gevalideerde alternatieve methoden in één laboratorium.
- NEN-EN-ISO 16140-4:2020 Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden – Deel 4: Protocol voor methodevalidatie in één laboratorium.
- NEN-EN-ISO 16140-5:2020 Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden – Deel 5: Protocol voor factoriele inter-laboratorium validatie voor niet-eigendomsrechtelijke methoden.
- NEN-EN-ISO 16140-6:2019 Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden - Deel 6: Protocol voor de validatie van alternatieve (eigendomsrechtelijke) microbiologische bevestigings- en typeringsmethoden.
- NEN-EN-ISO 19036:2019 Schatting van meetonzekerheid voor kwantitatieve bepalingen.

Microbiologische methoden worden onderscheiden in:

- kwalitatieve methoden of grensreacties (aantonen van micro-organismen (bacteriën/virussen)). 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) en/of mondiaal (ISO, IDF) niveau vastgesteld. Voor het microbiologisch onderzoek van monsters van de voedselketen en water is een aantal referentiemethoden gevalideerd, met name op het gebied van pathogenen. De prestatiekenmerken van deze referentiemethoden zijn als bijlage aan de norm toegevoegd. Voor een referentiemethode geldt dat voor ingebruikname geen volledige validatie vereist is; een verificatie is voldoende. De volgende prestatiekenmerken voor verificatie moeten door de gebruiker voor zijn eigen situatie worden vastgesteld:

- kwalitatieve methode: aantoonbaarheidsgrens ($eLOD_{50}$ voor voedselketen en water);
- kwantitatieve methode:
 - Voor de voedselketen: juistheid ($eBias$), reproduceerbaarheid (S_{IR});
 - Voor water: gevoeligheid, specificiteit, efficiency, selectiviteit, vals-positieve ratio, vals-negatieve ratio, herhaalbaarheid en telonzekerheid.
- Naast bovengenoemde prestatiekenmerken moet, volgens de EN-ISO/IEC 17025:2017, ook nog de meetonzekerheid worden vastgesteld (zie [hoofdstuk 3](#) en EN-ISO/IEC 17025:2017 7.6) en moet worden deelgenomen aan ringonderzoeken (zie [4.3](#) en EN-ISO/IEC 17025:2017 7.7).

In [bijlage A](#) staan, voor het toepassingsgebied van de microbiologie van de voedselketen, aanwijzingen voor het vaststellen van de volgende prestatiekenmerken: juistheid (eBias), reproduceerbaarheid (s_{IR}), meetonzekerheid en aantoonbaarheidsgrens (eLOD₅₀).

In [bijlage B](#) staan, voor het toepassingsgebied van de microbiologie in de matrix water, aanwijzingen voor het vaststellen van de volgende prestatiekenmerken: gevoeligheid, specificiteit, efficiency, selectiviteit, vals-positieve ratio, vals-negatieve ratio, herhaalbaarheid, telonzekerheid en meetonzekerheid.

Indien een nieuwe versie (revisie) van een normmethode wordt uitgegeven is het in principe nodig om de methode opnieuw te verifiëren. In de microbiologie van de voedselketen is afgesproken wanneer een gewijzigde normmethode (ISO en/of CEN en/of NEN methode) moet worden geverifieerd en wanneer dit niet nodig is. Bij de beoordeling van de gewijzigde normmethode wordt er in de introductie van de norm aangegeven of de technische wijzigingen van de normmethode groot (major change) of klein (minor change) zijn. Indien de technische wijzigingen klein zijn is het niet nodig om de methode opnieuw te verifiëren in het laboratorium. Indien de technische wijzigingen groot zijn dan wordt de normmethode opnieuw gevalideerd door ISO of CEN waarna een beoordeling wordt uitgevoerd of de wijzigingen in de prestatiekenmerken van de methode groot of klein zijn. Indien deze klein zijn dan hoeft de methode niet opnieuw door het lab te worden geverifieerd. Indien deze groot zijn dan is een nieuwe verificatie van de methode door het laboratorium nodig.

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 door het laboratorium is aangebracht. Voor een gewijzigde methode is een hervaldatie nodig gericht op die prestatiekenmerken die redelijkerwijs door de verandering kunnen zijn beïnvloed. Voor het valideren van een dergelijke wijziging is voor de voedselketen de NEN-EN-ISO 16140-4:2020 ontwikkeld.

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

Een eigen methode is een methode die niet is opgenomen in een (ISO en/of CEN en/of NEN) normmethode of een andere referentiemethode die internationaal erkend en breed geaccepteerd is (definitie uit NEN-EN-ISO 16140-1:2016).

Een eigen methode kan bijvoorbeeld zijn:

1. een methode die door het laboratorium zelf is ontwikkeld;
2. een alternatieve (eigendomsrechtelijke) methode die niet gevalideerd is door een onafhankelijke organisatie (validatie die door de producent zelf is uitgevoerd valt hier dus niet onder);
3. een referentiemethode of gevalideerde alternatieve methode die buiten het toepassingsgebied van de methode wordt gebruikt (tenzij voldaan wordt aan tenminste één van de voorwaarden genoemd in RvA- T001);
4. voor de microbiologie van de voedselketen geldt vanaf 1-1-2028 dat dit ook van toepassing is op niet-gevalideerde referentiemethoden (zie ook [bijlage A](#)).

Dergelijke methoden moeten (volledig) worden gevalideerd. Een dergelijke werkwijze staat voor de voedselketen beschreven in NEN-EN-ISO 16140-4:2020 en/of NEN-EN-ISO 16140-5:2020. Voor water wordt hiervoor verwezen naar de NEN-EN-ISO 13843:2017.

Voor het toepassen van een (alternatieve) methode buiten het toepassingsgebied moet deze als eigen methode op de verrichtingenlijst worden vermeld en als zodanig zijn gevalideerd (tenzij voldaan wordt aan tenminste één van de voorwaarden genoemd in RvA- T001).

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, moleculairbiologische of instrumentele technieken. Voor de validatie van deze technieken en het vaststellen van de gelijkwaardigheid aan de referentiemethode is NEN-EN-ISO 16140-2:2016 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 NEN-EN-ISO 16140-2:2016. De NEN-EN-ISO 16140-2:2016 is voor het toepassingsgebied “microbiologie van de voedselketen” ontwikkeld, maar kan ook gebruikt worden voor de watermicrobiologie (zie EU richtlijn 2015/1787).

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

Op de certificaten staat de geldigheidsduur van de alternatieve methode. Wanneer deze verlopen is, doordat de fabrikant geen verlenging heeft aangevraagd, wordt de methode als een ‘eigen methode’ opgevat en dient het laboratorium de methode zelf te valideren om zijn voortgezette geschiktheid aan te tonen.

3 Meetonzekerheid

Voor de bepaling van de meetonzekerheid van microbiologische verrichtingen op het gebied van voedingsmiddelen, diervoeders en omgevingsmonsters wordt verwezen naar ISO 19036:2019, Microbiologie van de voedselketen - Schatting van meetonzekerheid voor kwantitatieve bepalingen. Deze norm is toepasbaar voor de kwantitatieve (tellingen) en voor semi-kwantitatieve (MPN) microbiologische verrichtingen. Zie ook [bijlage A](#).

Voor de bepaling van de meetonzekerheid van microbiologische watermethoden is ISO 29201:2012 ontwikkeld, deze norm is niet als NEN-norm overgenomen. In overleg met de NEN-normsub-commissie ‘Microbiologische parameters’ is besloten om de NEN-EN-ISO 19036:2019 ook toe te staan voor watermethoden.

In RvA-T015 wordt gesteld dat een verklaring over de geschatte meetonzekerheid gerapporteerd dient te worden in gevallen dat de onzekerheid invloed heeft op het voldoen aan een specificatielimit. Dit hoeft o.a. niet als de meetonzekerheid geen onderdeel uitmaakt van de toetsing, zoals het geval is bij

de microbiologie. Bij het beoordelen van een resultaat aan bijvoorbeeld de microbiologische wettelijke criteria wordt namelijk geen rekening gehouden met de meetonzekerheid.

4 Toepassing van kwaliteitscontroles

In EN-ISO/IEC 17025:2017 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 (op de RvA-scope in de kolom Materiaal of product), 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 uitvoerenden 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 8199:2018 en NPR 6268:2012 (voor watermicrobiologie) en NEN-EN-ISO 7218:2007 (voedselketen) dienen. Ten aanzien van kwaliteitscontroles wordt bovendien verwezen naar paragraaf 7.7 over het borgen van de kwaliteit van de resultaten in EN-ISO/IEC 17025:2017.

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, een positieve en eventueel een negatieve controle mee te nemen. De eerstelijnscontrole dient alle stappen van het analyseproces te omvatten. Eerstelijnscontroles kunnen de volgende parameters omvatten.

Blanco controle: Een blanco controle, zoals een steriel proefmonster, geeft 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 kwantitatieve controle 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 toevalligerwijs 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; materiaal of product) 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 ingangscntrole 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 7218:2007 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. 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 EN-ISO/IEC 17025:2017 (paragraaf 7.7) 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 om aan verschillende soorten microbiologische proficiencyttesten deel te nemen, bijvoorbeeld op het gebied van diervoeders, zuivel, (drink)water en voedingsmiddelen. Buitenlandse organisaties die proficiencyttesten 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 EN-ISO/IEC 17043-accreditatie heeft voor het verzorgen van proficiencyttesten, 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’

Sinds de publicatie van versie 4 (30-01-2019) van het RvA T001 document is het niet meer toegestaan de termen ‘conform’ en ‘gelijkwaardig aan’ in de verrichtingenlijst op te nemen. Het blijft echter wel van belang dat de klant geïnformeerd wordt over welke methode wordt toegepast, hieronder valt ook het gebruik van een conforme of gelijkwaardig aan methode. 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 (materiaal of product). Laboratoria kunnen geen conformiteit of gelijkwaardigheid claimen voor matrices afwijkend van de matrix die in de desbetreffende norm is opgenomen (tenzij voldaan wordt aan tenminste één van de voorwaarden genoemd in RvA- T001). Het is de verantwoordelijkheid van de branche zelf om ervoor te zorgen dat referentiemethoden worden opgesteld voor, of uitgebreid worden met, andere matrices.

“Conform” mogelijk bij:

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

“Gelijkwaardig aan” 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 16140-2:2016;
- één plaat per verdunning zonder een opeenvolgende verdunning toe te passen;
- voor klassieke watermethoden volgens NEN-EN-ISO 17994:2014.

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

- 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 (materiaal of product);
- het toepassen van een andere monstergrootte dan in de norm vastgelegd.

6 Verrichtingenlijst (scope van accreditatie)

Zoals in RvA-T025 wordt aangegeven, dient in de titel van de verrichtingenlijst (scope) zoveel mogelijk essentiële informatie vermeld te worden. Hierbij wordt zoveel mogelijk de titel van het referentiedocument gebruikt, gevolgd door de gebruikte techniek (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 16140-2:2016. Deze gelijkwaardigheid kan in de scope aangegeven worden door het AFNOR- of MicroVal-certificaatnummer te vermelden.

Richtlijn voor het opstellen van een scope microbiologie

Algemeen (zie T025)

Nr.	Materiaal of product	Verrichting/Onderzoeksmethode	Intern referentienummer
Volgnummer	Gevalideerde matrix zoals drinkwater, voedingsmiddelen	Titel van de test (Het aantonen van, bij grensreactie, Het bepalen van het aantal, bij telling), inclusief incubatietemperatuur en de techniek en/of, indien relevant, medium Techniek kan zijn: telplaatmethode, grensreactie, PCR, etc.	Gehanteerde interne unieke code van het werkvoorschrift normmethode of eigen methode

Voorbeelden voor klassieke methoden

Nr.	Materiaal of product	Verrichting/Onderzoeksmethode	Intern referentienummer
1	Drinkwater (Matrix A)	Het bepalen van het aantal <i>Legionella</i> ; membraanfiltratie, medium A, B	SOP a NEN-EN-ISO 11731 (procedure 8, 9, 10)
2	Voedingsmiddelen met een wateractiviteit van 0,95	Het bepalen van het aantal schimmels en gisten bij 25 °C; telplaatmethode, DRBC	SOP b NEN-ISO 21527-2
3	Drink-, grond-, oppervlakte- en zwembadwater	Het bepalen van het aantal sporen van sulfiet reducerende clostridia; membraanfiltratie, SIA	SOP c NEN-ISO 6461-2
4	Drink-, oppervlakte- en grondwater	Het bepalen van het koloniegetal bij 25 °C; strijkplaatmethode, R2A-agar	SOP d NEN 6276
5	Voedingsmiddelen en diervoeders	Het bepalen van het aantal <i>Bacillus cereus</i> bij 30 °C; strijkplaatmethode, MYP	SOP e NEN-EN-ISO 7932
6	Levensmiddelen	Het aantonen van <i>Salmonella</i> , grensreactie, XLD en BGA	SOP f NEN-EN-ISO 6579:2002 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ verwijzing naar een vervallen normmethode; jaartal vereist (vigerende versies; zonder jaartal)

Voorbeeld voor alternatieve methode

Nr.	Materiaal of product	Verrichting/Onderzoeksmethode	Intern referentienummer
7	Levensmiddelen en diervoeders	Het aantonen van <i>Salmonella</i> ; grensreactie, PCR	SOP g NEN-EN-ISO 6579:2002 (Microval 2011-LR39) ⁽¹⁾

⁽¹⁾ door het weergeven van het certificaat tussen haakjes wordt aangegeven dat hier gebruik wordt gemaakt van een ISO 16140-2 gevalideerde methode die door een derde partij is gecertificeerd volgens de eisen uit verordening 2073/2005.

Voorbeelden van (alternatieve) bevestigingsmethoden

Nr.	Materiaal of product	Verrichting/Onderzoeksmethode	Intern referentienummer
8	Isolaten afkomstig uit drink-, grond-, oppervlakte- en zwembadwater	Het bevestigen van verdachte <i>Legionella</i> bacteriën; PCR	SOP g NEN-EN-ISO 11731
9	Isolaten afkomstig uit drink-, grond-, oppervlakte- en zwembadwater	Het bevestigen van bacterie-isolaten; MALDI-TOF MS, massaspectrometrie <i>E. coli</i> , bacteriën van de coligroep, <i>C. perfringens</i> , Enterococcon, <i>Legionella pneumophila</i> en <i>nonpneumophila</i>	SOP i <i>E. coli</i> en bacteriën van de coligroep: NEN-EN-ISO 9308-1 <i>C. perfringens</i> : NEN-EN-ISO 14189 Enterococcon: NEN-EN-ISO 7899-2 <i>Legionella pneumophila</i> en <i>L. non-pneumophila</i> : eigen methode
10	Isolaten afkomstig uit drink-, grond-, oppervlakte- en zwembadwater	Identificatie van bacteriën van de coligroep m.b.v. een biochemische testkit	SOP j eigen methode
11	Salmonella-isolaten uit pluimvee	Serotypering van <i>Salmonella</i> ; agglutinatie-reactie volgens White-Kauffman-Le Minor schema: <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Hadar</i> , <i>S. Infantis</i> , <i>S. Virchow</i> , <i>S. Paratyphi B</i> var. Java	SOP k NPR-CEN-ISO/TR 6579-3

Voorbeelden van gecombineerde methoden

Nr.	Materiaal of product	Verrichting/Onderzoeksmethode	Intern referentienummer
12	Drink-, grond-, oppervlakte- en zwembadwater	Het bepalen van het aantal <i>Escherichia coli</i> ; membraanfiltratie (rapid test) en MALDI-TOF bevestiging	SOP l NEN-EN-ISO 9308-1
13	Producten bestemd voor humane en dierlijke consumptie en omgevingsmonsters	Het aantonen van <i>Listeria monocytogenes</i> ; grensreactie; bevestiging met behulp van MALDI-TOF	SOP m isolatie: NEN-EN-ISO 11290-1, bevestiging: NEN-EN-ISO 11290-1 (MicroVal 2017LR75)

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 Rapportage van lage aantallen

In NEN-EN-ISO 7218:2007 (voedselketen) en NEN-EN-ISO 8199:2018 (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. 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 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 bijvoorbeeld < 100 kve per gram bij vaste producten of < 10 kve per ml bij vloeistoffen.

In NEN-EN-ISO 7218:2007 wordt bij zeer lage aantallen (voor 1 - 3 kolonies) voorgeschreven en in NEN-EN-ISO 8199:2018 (voor 1 – 2 kolonies) geadviseerd om geen getal meer te rapporteren, maar bijvoorbeeld < 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. EN-ISO/IEC 17025:2017 geeft de laboratoria echter op grond van § 7.8.1.2 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 STEC

In het kader van de harmonisatie van het STEC-onderzoek is in [bijlage C](#) een toelichting opgenomen voor de uitvoering van het onderzoek, de rapportage van resultaten en de vermelding van deze bepaling op de scope.

9 Belangrijke wijzigingen ten opzichte van de vorige versie

Ten opzichte van versie 3 zijn de volgende significante wijzigingen doorgevoerd:

- verificatie toegevoegd aan hoofdstuk 2
- matrix water is opgenomen (§ 2.2, 2.4, 2.5, 3, 5, 6, bijlage B)
- overzicht van methoden voor toepassingsgebied microbiologie van de voedselketen zijn toegevoegd (§ 2.1)
- prestatiekenmerken voor kwantitatieve methode zijn aangevuld (§ 2.2)
- toelichting op validatie of verificatie bij revisie van normmethode (§ 2.2)
- verlopen geldigheidsduur van alternatieve methode (§ 2.5)
- toepassen NEN-EN-ISO 19036:2019 voor bepaling meetonzekerheid water (hoofdstuk 3)
- rapporteren geschatte meetonzekerheid (hoofdstuk 3)
- richtlijnen voor het opstellen van een microbiologie scope (hoofdstuk 6) of naar T025
- toelichting STEC (hoofdstuk 8 en bijlage C; was bijlage B)
- aanpassing van literatuur (hoofdstuk 10)
- aanpassingen bijlage A (gesplitst in voedselketen en water (bijlage B)).

10 Literatuur

- NEN 6603:2010; Milieu en voedingsmiddelen – Eerstelijnscontrole met controlekaarten voor chemische en microbiologische analyses
- NEN 7777:2011/C1:2012; Milieu en voedingsmiddelen - Prestatiekenmerken van meetmethoden
- NEN-EN-ISO 7218:2007; A1:2014-04 Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders – Algemene eisen en richtlijnen voor microbiologische onderzoeken
- NEN-EN-ISO 8199:2018; Water – Algemene Eisen en richtlijnen voor microbiologisch kweekonderzoek
- NEN-EN-ISO 13843:2017; Water - Eisen voor het vaststellen van prestatiekenmerken voor kwantitatieve microbiologische analysemethoden
- NEN-EN-ISO 16140-1:2016; Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden - Deel 1: Woordenlijst
- NEN-EN-ISO 16140-2:2016; Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden - Deel 2: Protocol voor de validatie van alternatieve (eigendomsrechtelijke) methoden tegen een referentiemethode
- NEN-EN-ISO 16140-3:2020; Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden - Deel 3: Protocol voor de verificatie van gevalideerde referentiemethoden en gevalideerde alternatieve methoden in één laboratorium
- NEN-EN-ISO 16140-4:2020; Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden - Deel 4: Protocol voor methode validatie in één laboratorium
- NEN-EN-ISO 16140-5:2020; Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden - Deel 5: Protocol voor de factoriele inter-laboratorium validatie voor niet-eigendomsrechtelijke methoden
- NEN-EN-ISO 16140-6:2019; Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden - Deel 6: Protocol voor de validatie van alternatieve (eigendomsrechtelijke) microbiologische bevestigings- en typeringsmethoden
- EN-ISO/IEC 17025:2017; Algemene eisen voor de competentie van beproevings- en kalibratielaboratoria
- NEN-EN-ISO 17994:2014; Water – Eisen voor de vergelijking van de relatieve opbrengst van micro-organismen met twee kwantitatieve methoden
- NEN-EN-ISO 19036:2019; Microbiologie van de voedselketen – Schatting van meetonzekerheid voor kwantitatieve bepalingen
- NPR 6268 :2012; Water - Algemene principes bij kwaliteitsborging van bacteriologisch onderzoek van water
- NPR-CEN-ISO/TS 13136:2012; Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Real-time polymerase chain reaction (PCR) voor de detectie van pathogenen in voedingsmiddelen - Horizontale methode voor de detectie van Shiga toxine-producerende *Escherichia coli* (STEC) en de bepaling van O157, O111, O26, O103 en O145 serogroepen
- ISO 29201:2012; Water - Variabiliteit van testresultaten en de meetonzekerheid van microbiologische telmethoden
- RvA-T001: versie 4; Verwijzing naar referentiemethoden op scopes van testlaboratoria

Bijlage A: Prestatiekenmerken voor microbiologisch onderzoek van de voedselketen

Richtlijn voor het vaststellen van relevante prestatiekenmerken in eigen situatie (beperkte validatie ofwel verificatie) voor microbiologische referentiemethoden van de voedselketen. Deze is gebaseerd op NEN-EN-ISO 16140-3:2020 en de NEN-EN-ISO 19036:2019 voor de meetonzekerheid.

De relevante prestatiekenmerken zijn gerelateerd aan de matrix. De NEN-EN-ISO 16140-3:2020 is bedoeld voor de verificatie van referentiemethoden en *gevalideerde* alternatieve methoden. In annex F van deze norm is opgenomen hoe de verificatie van *niet-gevalideerde* referentiemethoden (zijnde NEN-EN-ISO normen) moet worden uitgevoerd. Dit is in principe een tijdelijke situatie waarvoor een overgangsregeling is ingesteld tot 1-1-2028. Deze overgangsperiode is opgenomen in het zogenaamde transitiedocument van ISO/TC34/SC9 (<https://www.iso.org/committee/47920.html>) dat is bedoeld als toelichting op de NEN-EN-ISO 16140-3:2020.

Dit document geeft ook aan hoe er omgegaan moet worden met reeds geaccrediteerde methoden nadat NEN-EN-ISO 16140-3:2020 is gepubliceerd.

Verificatie

Bij de verificatie moet het laboratorium de relevante prestatiekenmerken in de eigen situatie vaststellen.

Voor kwalitatieve methoden dient alleen de aantoonbaarheidsgrens (eLOD₅₀) te worden vastgesteld. Voor kwantitatieve methoden betreft het de prestatiekenmerken juistheid (eBias), binnenlaboratorium-reproduceerbaarheid (s_{IR}) en meetonzekerheid.

De juistheid en meetonzekerheid (maar niet de binnenlaboratoriumreproduceerbaarheid zoals beschreven in NEN-EN-ISO 16140-3:2020) zijn afhankelijk van het toepassingsgebied (matrix; materiaal of product) van de methode. Het matrixeffect wordt 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. Dit wordt ook toegelicht in NEN-EN-ISO 16140-3:2020.

Matrix (op de RvA-scope het Materiaal of product)

Bij de keuze van commerciële methoden die volgens NEN-EN-ISO 16140-2:2016 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.

In analogie met de NEN-EN-ISO 16140-1:2016 is het voor voedingsmiddelen gebruikelijk geworden om in plaats van 'matrix' te praten over 'categorie', 'type' en '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 'item' (product) wordt het voedingsmiddel zoals gehakt, salami, kaas, etc. verstaan. De uitwerking van de indeling in 'categorie', 'type' en 'item' is opgenomen in Annex A van de NEN-EN-ISO 16140-2 of 3.

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 'item' uit een ander 'type' te kiezen om het effect van de behandeling mee te nemen.

Het aantal en de keuze voor een 'item' die meegenomen wordt in een verificatiestudie hangt af van het toepassingsgebied waarop de methode is gevalideerd en het laboratorium deze wil gaan gebruiken. Het minimale aantal 'items' en 'categorieën' voor verificatie is vastgelegd in de NEN-EN-ISO 16140-3:2020.

Aantoonbaarheidsgrens (eLOD₅₀)

Bij kwalitatieve bepalingen is het moeilijk de aantoonbaarheidsgrens exact vast te stellen. Theoretisch kan de aanwezigheid van één kolonievormende eenheid in een gekozen hoeveelheid monstermateriaal (testportie) bepaald worden, bijvoorbeeld de aantoonbaarheid van *Salmonella* in 25 g. Door de mate van sublethale beschadiging van het gezochte organisme, de aanwezige stoorflora en andere matrixinvloeden is dit niet altijd het geval. Theoretisch wordt 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 wordt bevonden. Het vaststellen van de aantoonbaarheidsgrens in een bepaalde 'item' wordt gedaan door het kunstmatig besmetten van testporties van een 'item'. 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 kunnen meerdere verdunningen van een referentiemateriaal of verdunde cultuur worden ingezet. In NEN-EN-ISO 16140-3:2020 is een drietal protocollen opgenomen hoe de eLOD₅₀ kan worden bepaald. De verschillen in de protocollen hangen samen met het aantal in te zetten verdunningen.

Juistheid (eBias)

De juistheid van een microbiologische bepaling is nooit exact te bepalen. In de NEN-EN-ISO 16140-3:2020 is ervoor gekozen om de juistheid voor een 'item' te bepalen aan de hand van recovery-experimenten. De bepaling van de eBias staat los van de NEN-EN-ISO 17025:2017-eis om deel te nemen aan ringonderzoeken/proficiencytesten (derdelijnscontrole). Bij een kwantitatieve methode dient de behaalde z-score tussen -2 en +2 te liggen.

Reproduceerbaarheid (s_{IR})

De reproduceerbaarheid die in normmethoden of in de validatierapporten van alternatieve methoden genoemd staat is meestal bepaald aan de hand van een interlaboratoriumonderzoek dat is uitgevoerd op basis van de NEN-EN-ISO 16140-2:2016.

In de NEN-EN-ISO 16140-3:2020 is ervoor gekozen om de bepaling van de reproduceerbaarheid te baseren op de standaarddeviatie van de intralaboratoriumreproduceerbaarheid (s_{IR}). De experimentele opzet is in lijn met die voor de bepaling van de meetonzekerheid volgens NEN-EN-ISO 19036:2019 voor wat betreft de bepaling van de zogenaamde technische onzekerheid. De technische onzekerheid is, op basis van de gekozen experimentele opzet, onafhankelijk van de geteste matrix en hoeft dus slechts eenmalig te worden vastgesteld. Het is erg belangrijk dat bij de uitvoering van de experimenten zo goed mogelijk rekening gehouden wordt met reproduceerbaarheidscondities waaronder de resultaten worden verkregen.

Meetonzekerheid

De bepaling van de meetonzekerheid van een analyseresultaat is een eis uit EN-ISO/IEC 17025:2017. Deze eis is alleen van toepassing voor kwantitatieve resultaten en niet voor kwalitatieve resultaten. De werkwijze voor de bepaling van de meetonzekerheid staat beschreven in NEN-EN-ISO 19036:2019. In deze norm is een onderscheid gemaakt naar verschillende onzekerheden die samen de totale meetonzekerheid omvatten. Deze onzekerheden zijn :

- de technische onzekerheid
- de matrixonzekerheid
- de verdelingsonzekerheid

De bepaling van de technische onzekerheid op basis van de intralaboratoriumreproduceerbaarheid (S_{IR}) staat ook beschreven in de NEN-EN-ISO 16140-3:2020. Deze is onafhankelijk van het 'item', maar moet wel per methode worden vastgesteld. Het is belangrijk dat alle variabelen aantoonbaar zijn meegenomen bij het vaststellen van de intralaboratoriumreproduceerbaarheid.

De matrixonzekerheid wordt afzonderlijk bepaald. De experimentele opzet hiervoor is gebaseerd op herhaalbaarheidsexperimenten. De gevonden matrixonzekerheid is onafhankelijk van de gebruikte analysemethode en hoeft dus slechts eenmalig te worden vastgesteld voor dat 'item' of groep van 'items'.

De verdelingsonzekerheid hoeft niet experimenteel te worden vastgesteld, maar is een theoretische onzekerheid die afhangt van het totaal aantal getelde kolonies en het aantal kolonies dat wordt bevestigd. Ook is de onzekerheid van een MPN-resultaat mee te berekenen.

De drie hoofdcomponenten van de onzekerheden worden bij elkaar gevoegd om de totale meetonzekerheid te bepalen. Er wordt in de NEN-EN-ISO 19036:2019 ook de mogelijkheid geboden om alleen de technische meetonzekerheid vast te stellen en te rapporteren aan de klant mits dit met de klant als zodanig is afgesproken.

Bijlage B: Prestatiekenmerken voor microbiologisch onderzoek van water

Richtlijn voor het vaststellen van relevante prestatiekenmerken in eigen situatie (beperkte validatie ofwel verificatie) voor microbiologische referentiemethoden voor onderzoek van water. Deze is gebaseerd op NEN-EN-ISO 13843:2017. Voor verificatie van kwalitatieve methoden wordt verwezen naar [bijlage A](#).

Matrix

De relevante prestatiekenmerken zijn gerelateerd aan de matrix.

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 met weinig stoorflora	Bijvoorbeeld: drinkwater, bronwater, schoon proceswater, flessenwater, schoon regenwater
Licht vervuild water met veel stoorflora	Bijvoorbeeld: proceswater, koeltorenwater, grondwater (bronwater), regenwater
Sterk vervuild water met zeer veel stoorflora	Bijvoorbeeld: afvalwater, oppervlaktewater
Behandeld water; aanwezigheid remmende of afdodende verbindingen	Bijvoorbeeld: zwembadwater (chloor), koeltorenwater (biocide)

(*) Op grond van de eigen ervaring van het laboratorium kan aan de hand van een onderbouwing het watersoort in een bepaalde categorie geplaatst worden. Bijvoorbeeld afhankelijk van de vervuiling kan koelwater zowel in de tweede of derde categorie vallen.

De opzet is om aan de hand van deze tabel een categorie uit te zoeken en de prestatiekenmerken voor één van de genoemde soorten vast te stellen. Bij de keuze is het ook van belang te kijken naar de norm. In een aantal waternormen zijn prestatiekenmerken opgenomen waar de eigen prestatiekenmerken aan getoetst kunnen worden.

Verificatie

Voor de verificatie van kwalitatieve methoden voor watermicrobiologie dient de aantoonbaarheidsgrens te worden vastgesteld. Zie hiervoor [bijlage A](#).

Voor de verificatie van selectieve kwantitatieve (kweek)methoden voor watermicrobiologie dienen de prestatiekenmerken te worden vastgesteld zoals beschreven in hoofdstuk 7 van NEN-EN-ISO 13843:2017. Dit betreffen de volgende prestatiekenmerken: gevoeligheid, specificiteit, efficiency, selectiviteit, vals positieve ratio, vals negatieve ratio, herhaalbaarheid en telonzekerheid. Aanvullend dient ook deelgenomen te worden aan ringonderzoeken en dient de meetonzekerheid te worden vastgesteld. Bij niet-selectieve kweekmethoden kunnen de categorische prestatiekenmerken (gevoeligheid, specificiteit, efficiency, selectiviteit, vals-positieve ratio, vals-negatieve ratio) niet worden vastgesteld.

In hoofdstuk 7 van NEN-EN-ISO 13843:2017 wordt informatie gegeven over hoe de prestatiekenmerken worden bepaald (m.u.v. de meetonzekerheid). Tabel 13 in hoofdstuk 7 van NEN-EN-ISO 13843:2017 geeft een volledig overzicht hoeveel monsters moeten worden gebruikt bij het vaststellen van de verschillende prestatiekenmerken. In deze tabel staat ook informatie over het aantal toe te passen (a-)typische kolonies en het aantal herhalingen. Bij de uitvoering voor het vaststellen van de prestatiekenmerken gaat de voorkeur uit naar het gebruik van natuurlijk besmette watermonsters. Mochten deze niet (of niet voldoende) voorhanden zijn dan kan gebruik worden gemaakt van (in volgorde van voorkeur): drinkwater aangeënt met oppervlaktewater of rioolwatereffluent; referentiematerialen; water aangeënt met meerdere stammen (reinculturen). Bij de laatste optie dient voor het aanenten een mengsel van meerdere verschillende typische stammen en meerdere verschillende atypische stammen gebruikt te worden. Als het te aanenten water van nature al atypische flora bevat, hoeft alleen aangeënt te worden met minimaal 2 verschillende typische stammen.

Informatie over het vaststellen van de meetonzekerheid staat beschreven in [hoofdstuk 3](#) van dit document.

Bijlage C: Richtlijn voor de werkwijze voor het onderzoek, rapportage en scope vermelding voor het bepalen van STEC (Shiga-toxine producerende E. coli)

Introductie:

Binnen de E. coli bacteriën is er een groep die in staat is om het Shiga-toxine te produceren vanwege het feit dat zij het STX-gen bevatten. Dit toxine ligt aan de basis van de ziekte die door STEC wordt veroorzaakt, zoals HUS (hemolytisch-uremisch syndroom). Naast het toxine zijn er aanvullende (genetische) eigenschappen van STEC die van invloed zijn op de ernst van de infectie veroorzaakt door STEC.

Het onderzoek naar STEC staat beschreven in de NPR-CEN-ISO/TS 13136:2012. De in deze norm opgenomen werkwijze is complex omdat het zowel een screening-, een isolatie- en een bevestigingstap omvat en er verschillende eigenschappen van STEC kunnen worden bepaald. Naast deze ISO-norm zijn er ook alternatieve (commerciële) methoden voor het onderzoek naar STEC op de markt.

In praktijk wordt niet altijd het complete onderzoek uitgevoerd dat in de NPR-CEN-ISO/TS 13136:2012 staat beschreven wat kan leiden tot onduidelijkheid over het gerapporteerde resultaat. Deze richtlijn is bedoeld om aanwijzingen te geven hoe de resultaten gerapporteerd en geïnterpreteerd moeten worden. Deze is zowel bedoeld voor laboratoria die het onderzoek uitvoeren en hiervoor geaccrediteerd zijn of willen worden alsook voor bedrijven die onderzoek willen laten uitvoeren naar STEC. Voor dergelijke bedrijven is met name het hoofdstuk over rapportage van belang.

Algemene werkwijze STEC methoden:

De algemene werkwijze voor het aantonen van STEC bestaat uit de volgende stappen:

het ophopen van product

het bepalen van de aanwezigheid van specifieke genen (minimaal een stx-gen) in de ophoping na incubatie (screening)

positieve monsters worden verder verwerkt door STEC te isoleren op een selectief medium (isolatie)

verdachte STEC kolonies worden hierna bevestigd door het aantonen van specifieke genen (minimaal de stx-genen) (bevestiging).

Rapportage STEC resultaten:

Het rapporteren van onderzoek naar STEC zal een duidelijk onderscheid moeten maken of het resultaat is verkregen in de ophoping (resultaat van de screening) of dat dit na isolatie is (resultaat na bevestiging). Daarnaast zal bekend moeten zijn naar welke genen (stx- en eae-genen) is gekeken. In onderstaande tabel is een overzicht gegeven van de voorkomende mogelijkheden.

Eerste fase: screenen in de ophoping	Eindresultaat voor op het rapport/certificaat indien alleen een screening wordt uitgevoerd	Tweede fase: isolatie en bevestiging	Eindresultaat voor op het rapport/certificaat na bevestiging van een geïsoleerde kolonie.
Geen stx- en eae- genen aangetoond	STEC niet aangetoond	Niet van toepassing	Niet van toepassing
Stx-genen aangetoond maar geen eae-gen aangetoond	Vermoedelijke aanwezigheid van STEC (stx +, eae -)	Geen stx- en eae- genen aangetoond in isolaten	Vermoedelijke aanwezigheid van STEC (stx +, eae -)
		Stx-genen aangetoond maar geen eae-gen aangetoond	STEC aangetoond
		Stx-genen en eae- gen aangetoond	STEC aangetoond met het eae-gen
Stx-genen en eae- gen aangetoond	Vermoedelijke aanwezigheid van STEC (stx +, eae +)	Geen stx- en eae- genen aangetoond in isolaten	Vermoedelijke aanwezigheid van STEC (stx +, eae +)
		Stx-genen aangetoond maar geen eae-gen aangetoond	STEC aangetoond
		Stx-genen en eae- gen aangetoond	STEC aangetoond met het eae-gen

Vermelding op scope (verrichtingenlijst):

Hierbij moet ook onderscheid gemaakt worden of het laboratorium geaccrediteerd is voor enkel de screening of ook voor de bevestiging. Daarnaast moet ook duidelijk zijn of de referentiemethode NPR-CEN-ISO/TS 13136:2012 wordt gebruikt of een alternatieve methode of een aanpassing van de NPR-CEN-ISO/TS 13136:2012.

De volgende vermelding op de scope wordt aangehouden:

Voor alleen het uitvoeren van de screening (1 verrichting):

Het aantonen van Shigatoxine producerende E.coli (STEC), screeningprocedure op stx- en eae-genen; kwalitatieve PCR-techniek

Voor het uitvoeren van screening en isolatie/bevestiging (2 verrichtingen):

Het aantonen van Shigatoxine producerende E.coli (STEC), screeningprocedure op stx- en eae-genen; kwalitatieve PCR-techniek

Het aantonen van Shigatoxine producerende E.coli (STEC), bevestigingprocedure op stx- en eae-genen; kwalitatieve PCR-techniek

Voor conformiteit of gelijkwaardigheid in de uitvoering van de methode wordt het volgende gehanteerd (van belang bij afspraken met de opdrachtgever, niet t.b.v. vermelding op de scope):

De methode wordt 'conform' uitgevoerd wanneer er door het laboratorium RT-PCR testen worden uitgevoerd met de primers/probes zoals beschreven in Annex E van NPR-CEN-ISO/TS 13136:2012.

De methode kan gelijkwaardig aan (met verwijzing naar een certificaat) worden uitgevoerd wanneer gebruik wordt gemaakt van een NEN-EN-ISO 16140-2:2016 gevalideerde methode ten opzichte van de NPR-CEN-ISO/TS 13136:2012 als referentiemethode. Hierbij wordt dan het certificaat van bijvoorbeeld MicroVal of AFNOR toegevoegd.

Een andere vorm van 'gelijkwaardig aan' is wanneer er geen essentiële afwijkingen zijn van de normmethode. Hieronder valt niet het gebruik van andere primers en probes dan aangegeven in de NPR-CEN-ISO/TS 13136:2012. Dit wordt dan gezien als een eigen methode.

De methode is een eigen methode wanneer er gebruik wordt gemaakt van commercieel verkrijgbare methoden die niet ISO 16140 zijn gevalideerd, waarvan de primers/probes niet bekend zijn of niet dezelfde als die in de NPR-CEN-ISO/TS 13136:2012.

Serotypering van STEC:

Serotypering wordt gezien als een apart onderzoek. Serotypering kan zowel worden uitgevoerd met behulp van PCR-onderzoek als met een klassieke bepaling met antisera. In de NPR-CEN-ISO/TS 13136:2012 staan PCR-testen beschreven voor een vijftal serotypen (O26, O103, O111, O145 en O157). Deze kunnen zowel worden uitgevoerd in de screeningsstap als na isolatie van een kolonie. Klassieke serotypering zal altijd gedaan worden op een geïsoleerde kolonie.

Indien serotypering is uitgevoerd gedurende de screening-stap zal dit expliciet vermeld moeten worden bij de rapportage van het resultaat. Normaal gesproken wordt er vanuit gegaan dat serotypering wordt uitgevoerd op een geïsoleerde kolonie en hoeft dit niet expliciet vermeld te worden in het rapport.

Voor de vermelding op de scope zullen alle serotypen genoemd moeten zijn waarvoor het laboratorium is geaccrediteerd, evenals de techniek die daarvoor gebruikt is en de status van de gebruikte methode.

Een voorbeeld van de vermelding van de serotypering voor STEC is hieronder aangegeven.

Nr.	Materiaal of product	Verrichting/Onderzoeksmethode	Intern referentienummer
14	STEC-isolaten uit levensmiddelen	Serotypering van STEC; PCR O26, O103, O111, O145 en O157	Methode n ISO/TS 13136