

Validatie, verificatie en meetonzekerheid bij microbiologische analyses

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure vervangt de procedure WAC/V/A/009 van juni 2020 en is van toepassing op nieuwe microbiologische methodevalidaties en -verificaties uitgevoerd vanaf het in voege treden van deze versie.

2 METHODEVALIDATIE EN -VERIFICATIE

Binnen de microbiologische analysemethoden wordt onderscheid gemaakt tussen:

- **Kwalitatieve methodes** (= aanwezigheid van bacteriën aantonen)
(bv. Bepaling van *Salmonella spp.* WAC/V/A/004)
- **Kwantitatieve methodes (telling)** (= aantallen bacteriën aantonen)

Methodes kunnen zowel gevalideerd als geverifieerd worden.

Volledige **methodevalidatie** is nodig bij ingebruikname van een nieuwe of gewijzigde methode. Hierbij worden de prestatiekenmerken bepaald voor methode karakterisatie en/of een vergelijkende studie ten opzichte van een referentiemethode, om gelijkwaardigheid tussen methodes aan te tonen.

Bij toepassing van referentiemethodes (WAC/V/A/001, WAC/V/A/002, WAC/V/A/003, WAC/V/A/004, WAC/V/A/005, WAC/V/A/006, WAC/V/A/007, WAC/V/A/008, WAC/V/A/010) volstaat een **verificatie** waarbij enkele prestatiekenmerken bepaald moeten worden. De referentiemethodes werden reeds uitgebreid gevalideerd. Het labo toont d.m.v. verificatie aan dat het deze techniek naar behoren kan uitvoeren.

In Tabel 1 wordt een overzicht gegeven van ISO-normen van toepassing op microbiologische methode validatie en verificatie. Gezien de referentiemethodes standaard geen validatie vereisen, zal verder in dit document de nadruk liggen op methodeverificatie.

		Validatie	Verificatie
Kwalitatieve methode	Prestatiekenmerken	ISO 16140-4 (<i>in house</i>) ISO 16140-5 (<i>interlaboratory</i>)	ISO 16140-3
Bevestigings-of identificatiemethode		ISO 16140-6 ISO 16140-7, ISO 16140-4 (+Amd.2)	ISO 16140-6 ISO 16140-7, ISO 16140-3 (+Amd.1) ISO 13843 (§7)
Kwantitatieve methode	Prestatiekenmerken	ISO 13843 (§6)	ISO 13843 (§7) ISO 16140-3
	Methode-vergelijking	ISO 17994	ISO 13843

Tabel 1: Overzicht van normen voor validatie en verificatie van microbiologische methoden

In het WAC-compendium zijn ook enkele alternatieve microbiologische methoden beschreven, die gevalideerd werden door onafhankelijke organisaties (bv. AFNOR (Franse organisatie)). De gebruiker van de alternatieve methode dient bijgevolg enkel de methode te verifiëren.

Het gebruik van log-getransformeerde data is niet standaard in de verschillende ISO- normen (vb. ISO 13843 werkt *niet* met log-getransformeerde data; ISO 16140 werkt wel met log-getransformeerde data).

Er dient, indien mogelijk, de voorkeur gegeven te worden aan het werken met \log_{10} getransformeerde data.

3 PRESTATIEKENMERKEN

De prestatiekenmerken worden bij voorkeur bepaald op natuurlijk gecontamineerde monsters. Indien deze niet beschikbaar zijn, kunnen (natuurlijke) monster gespiked worden met gecontamineerd natuurlijk materiaal (voorkeur) of referentiestammen.

Richtlijnen betreffende aantallen te analyseren monsters zijn terug te vinden in de respectievelijke normen.

Een overzicht van prestatiekenmerken en de bijhorende acceptatiecriteria wordt gegeven in Tabel 2 voor kwantitatieve methoden en in Tabel 3 voor kwalitatieve methoden.

Specifieke situaties kunnen een afwijking van de norm vragen. Dit wordt toegestaan mits technische motivatie.

Kwantitatieve methodes		
Validatie	Verificatie	Criteria
- Sensitiviteit (gevoeligheid) (%), - Specificiteit (%), - Efficiëntie (nauwkeurigheid) (%), - Selectiviteit (%), - Vals positieve ratio (%), - Vals negatieve ratio (%), - LOD ₉₅ , - LOQ, - Lineariteit, - Robuustheid, - Telonzekerheid (intralabo), - Herhaalbaarheid (log en %), - Intralaboratorium-reproduceerbaarheid (log en %)	- Sensitiviteit (gevoeligheid) (%), - Specificiteit (%), - Efficiëntie (nauwkeurigheid) (%), - Selectiviteit (%), - Vals positieve ratio (%), - Vals negatieve ratio (%), - Telonzekerheid (intralabo), - Herhaalbaarheid (log en %), - Intralaboratorium-reproduceerbaarheid (log en %)	>= 90% >= 80% >= 90% >= 10% - - - - - - < 10% $s_r(\log_{10}) < 0.15$ $s_R(\log_{10}) < 0.25$

Tabel 2: Prestatiekenmerken kwantitatieve methodes

Kwalitatieve methodes		
Validatie	Verificatie	Criteria
- Sensitiviteit (gevoeligheid) (%), - Specificiteit (%), - Efficiëntie (nauwkeurigheid) (%), - Selectiviteit (%), - Vals positieve ratio (%), - Vals negatieve ratio (%), - LOD50, - Robuustheid	- LOD50	>= 90% >= 80% >= 90% >= 10% - - - -

Tabel 3: Prestatiekenmerken kwalitatieve methodes

Prestatiekenmerken voor validatie van MALDI-TOF voor bevestiging van kolonies zijn raadpleegbaar in ISO 16140-6.

Indien MALDI-TOF reeds gevalideerd is (bv. AOAC), dient enkel een verificatie uitgevoerd te worden volgens ISO 13843 (§7).

4 MEETONZEKERHEID

De meetonzekerheid van een methode is een niet-negatieve parameter die de spreiding van waarden karakteriseert die, op basis van de gebruikelijke informatie, aan de meetgrootte kan worden toegekend. (NEN 7779; ISO/IEC Guide 98-1)

Meetonzekerheid moet enkel bepaald worden op kwantitatieve methoden, zowel bij methode validatie als verificatie.

Verschillende factoren dragen bij aan de totale meetonzekerheid (ISO 19036):

1. Technische onzekerheid
2. Matrix onzekerheid
3. Verdelingsonzekerheid
 - a. Poisson onzekerheid
 - b. Bevestiging onzekerheid

De technische onzekerheid wordt bepaald op basis van de intralaboratorium reproduceerbaarheid (S_R) en is minimaal nodig voor het bepalen van de meetonzekerheid van het resultaat. (ISO 19036; ISO 29201)

De uitgebreide meetonzekerheid (U) wordt in dit geval berekend door:

$$U = 2 \cdot S_R$$

Waarbij

U = uitgebreide meetonzekerheid in \log_{10}

S_R = intralaboratorium reproduceerbaarheid in \log_{10}

5 REFERENTIES

ISO 16140-3: Microbiology of the food chain - Method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory

ISO 16140-4: Microbiology of the food chain - Method validation Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory

ISO 16140-5: Microbiology of the food chain - Method validation Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods

ISO 16140-6: Microbiology of the food chain - Method validation Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures

ISO 16140-7: Microbiology of the food chain — Method validation Part 7: Protocol for the validation of identification methods of microorganisms

ISO 13843: Water quality - Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods

ISO 17994: Water quality - Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods

NEN 7779: Environment, food and feed – Measurement uncertainty

ISO/IEC Guide 98-1: Guide to the expression of uncertainty in measurement - Part 1: Introduction

ISO 19036: Microbiology of the food chain - Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations

ISO 29201 Water quality - The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods

ISO 16140-3/Amd1: Microbiology of the food chain - Method validation - Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory - Amendment 1: Protocol for verification of validated identification methods of microorganisms

ISO 16140-4/Amd2: Microbiology of the food chain - Method validation - Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory - Amendment 2: Protocol for single-laboratory validation of identification methods of microorganisms.