



Nieuws uit het Nationale en Internationale Normalisatie (Net)Werk

Arnold Dijkstra

Principal Microbiology, CSK food enrichment

Normalisatie en normen

Deze presentatie gaat over normalisatie en normen in het algemeen en over microbiologische normen in het bijzonder.

Normalisatie is “het proces om te komen tot een norm. Dit proces is open, transparant en gericht op consensus en vindt plaats in normcommissies die bestaan uit vertegenwoordigers van alle betrokken partijen. Dit gebeurt niet alleen op nationaal niveau, maar ook in Europees en mondiaal verband.” ¹

Een norm is “een vrijwillige afspraak tussen partijen over een product, dienst of proces. Normen zijn geen wetten, maar ‘best practices’. Iedereen kan - op vrijwillige basis - hier zijn voordeel mee doen. In zakelijke overeenkomsten bieden ze marktpartijen duidelijkheid over, en vertrouwen in producten, diensten of organisaties en dagen de maatschappij uit te innoveren.” ¹

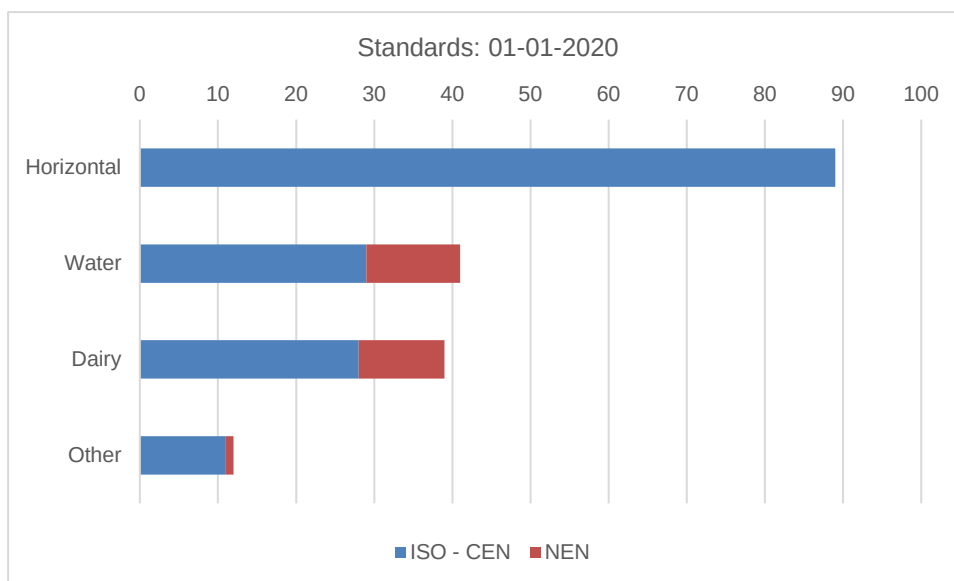
Normalisatie gaat binnen de analytische microbiologie dus vooral om vertrouwen, en acceptatie van elkaars resultaten van onderzoek.

Het domein van de microbiologie omvat normalisatie van methoden voor het kwalitatief en kwantitatief aantonen van micro-organismen, inclusief virussen, parasieten en (schadelijke) metaboliëten van deze organismen. Naast methoden, richt de normalisatie zich ook op

- de basisvoorwaarden om het onderzoek op juiste wijze uit te voeren;
- het vaststellen dat analysemethoden daadwerkelijk ‘werken’ (validatie, verificatie);
- het opzetten en uitvoeren van ringonderzoeken en challenge testen.

In totaal zijn er (momenteel) 177 normen in omloop. Ongeveer de helft daarvan is horizontaal, wat betekent dat ze toepasbaar zijn voor ‘alle commodity’s’ in de voedselketen. Dit zijn voor 100% internationale normen (ISO, CEN, IDF) die soms als Nederlandse Norm worden overgenomen. De andere helft betreft verticale normen bedoeld voor melk- en melkproducten (zuivel), water en een heel beperkt aantal voor overige commodity’s. Hiervan is (nog) een deel alleen als Nederlandse Norm ontwikkeld. Zie ook het figuur op de volgende bladzijde.

¹ NEN.nl – geraadpleegd 30-1-2020



Trends in de normalisatie

Het normalisatieproces en de daaruit voortkomende normen laten een aantal trends zien.

- Verschuiving van verticale 'commodity specifieke' normen naar horizontale normen. Er is nog een beperkt aantal (microbiologische) specifieke zuivel- en waternormen. Voor de Nederlandse zuivelnormen (NEN) geldt dat een deel mogelijk als basis dient voor een nog te ontwikkelen internationale norm. De resterende normen blijven als Nederlandse norm bestaan zolang de zuivelsector daar behoefte aan heeft.
- Hoewel de samenwerking tussen normalisatie (werk)groepen actief in voeding en water steeds intensiever samenwerken, is het (helaas) niet de verwachting dat er op korte termijn (inter)nationale microbiologische normen voor de voedselketen en water ontwikkeld gaan worden
- Er worden nog maar heel weinig nieuwe normen ontwikkeld voor klassieke, microbiologische methoden. Bij revisie van bestaande normen ligt de focus bij optimalisatie en het toevoegen van prestatiekenmerken. Er wordt zelden een horizontale norm ingetrokken.
- De aandacht voor de betrouwbaarheid van de analyseresultaten en de wijze waarop resultaten geïnterpreteerd mogen worden in relatie tot bijvoorbeeld (wettelijke) grenswaarden, blijft toenemen. Wiskunde en statistiek zijn onmisbare disciplines geworden binnen het normalisatiewerk (en dat is voor veel microbiologen een hele uitdaging).
- Er worden in toenemende mate normen gemaakt voor 'nieuwe' methoden voor kwalitatief en/of kwantitatief onderzoek naar specifieke micro-organismen met behulp van (RT)-PCR, Flowcytometrie, LC-MS. Dit is best ingewikkeld omdat het hier niet zelden over methoden gaat die als geheel testsysteem worden aangeboden door een leverancier. Omdat normalisatie onafhankelijk dient te zijn van de commerciële markt, richten normen zich op de principes van de techniek en technologie.
- In voorbereiding is een ISO voor het typeren van voedselpathogenen met behulp van Whole Genome Sequencing (WGS). WGS is bezig aan een opmars. In 2013 paste nog geen enkele Europese lidstaat WGS toe, in 2017 gebruikten twintig landen in de Europese Unie de

methode. In 2019 was WGS cruciaal bij de detectie van *Listeria*-bij vleeswaren recall Offerman.²

- In het verleden was internationale normalisatie vooral een aangelegenheid van ‘ontwikkelde landen’ (Europa, USA, Australië). De laatste jaren is er sprake van een toenemende betrokkenheid vanuit Azië, Afrika en Zuid-Amerika. China, met zelf een enorm portfolio aan normen (GB-standaarden), begint meer en meer invloed te krijgen op de ontwikkeling van normen.

De genoemde verschuivingen vragen ook andere expertise binnen het normalisatiewerk. In toenemende mate zijn biochemische, moleculair biologen en bio-informatici nodig.

Microbiologische normen uitgebracht in 2019

ISO 16297	Revised	Milk – Bacterial count - Protocol for the validation of alternative methods
ISO 7870-1	Revised	Control charts - Part 1: General guidelines
ISO 12869	TS - Revised	Water quality - Detection and quantification of <i>Legionella spp.</i> and/or <i>Legionella pneumophila</i> by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)
ISO 15216-2	New	Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection
ISO 16140-6	New	Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures
CEN/TS 17329-1	New	Voedingsmiddelen - Algemene richtlijnen voor de validatie van kwalitatieve real-time PCR methoden - Deel 1: Validatie in een enkel laboratorium
CEN/TS 17329-2	New	Voedingsmiddelen - Algemene richtlijnen voor de validatie van kwalitatieve real-time PCR methoden - Deel 2: Interlaboratoriumonderzoek
ISO 17410	New (dairy included)	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms
ISO 17995	Revised	Water quality - Detection and enumeration of thermotolerant <i>Campylobacter</i> species
ISO 19036	Revised	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations (Amendment 1: Measurement uncertainty for low counts)
ISO 20976-1	New	Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and maximum growth rate
ISO 22117	Revised	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison

² www.vmt.nl, geraadpleegd 30-1-2020

Microbiologische normen - work in progress

NEN 6821	Ontwerp AMD1	Gepasteuriseerde melk en vloeibare melkproducten - Aantonen van nabesmetting
NEN 6877	Ontwerp	Melk en melkproducten - Aantonen van sporen van boterzuurbacteriën en bepaling van het gehalte aan sporen van boterzuurbacteriën volgens de MPN-methode
ISO 6579-4	PWI	Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of <i>Salmonella</i> - Part 4: Identification of monophasic <i>Salmonella</i> Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) by polymerase chain reaction (PCR)
ISO 7218	CD	Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations
ISO 7870-7	CD	Control charts — Part 7: Multivariate control charts
ISO 7870-9	FDIS	Control charts — Part 9: Control charts for auto correlated processes
ISO 15213-1	CD	Microbiology of the food chain . Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Clostridium</i> spp. — Part 1: Enumeration of sulphite-reducing <i>Clostridium</i> spp. by colony-count technique
ISO 15213-2	CD	Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Clostridium</i> spp. — Part 2: Enumeration of <i>Clostridium perfringens</i> by colony-count technique
ISO 15213-3	CD	Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Clostridium</i> spp. — Part 3: Detection of <i>Clostridium perfringens</i>
ISO 16140-3	FDIS	Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of validated reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
ISO 16140-4	FDIS	Microbiology of the food chain — Method validation — Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory
ISO 16140-5	FDIS	Microbiology of the food chain — Method validation — Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods
ISO 20976-2	WD	Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 2: Challenge tests to study inactivation potential and kinetic parameters
ISO 23036-1	DIS	Microbiology of the food chain — Methods for the detection of Anisakidae L3 larvae in fish and fishery products — Part 1: UV-press method
ISO 23036-2	DIS	Microbiology of the food chain — Methods for the detection of Anisakidae L3 larvae in fish and fishery products — Part 2: Artificial digestion method
ISO 23418	CD	Microbiology of the food chain — Whole genome sequencing for typing and genomic characterization of foodborne bacteria — General requirements and guidance

Toelichting herziening ISO 7218

ISO 7218 'Microbiology of the food chain - General requirements and guidance for microbiological examinations' wil de betrouwbaarheid van microbiologisch onderzoek in de voedselketen helpen waarborgen. Een ander doel is om te zorgen dat de algemene onderzoekstechnieken bij en resultaten van verschillende laboratoria zoveel mogelijk hetzelfde zijn. Bovendien kan het document bijdragen aan de veiligheid van laboratoriumpersoneel door infectierisico's te voorkomen. ISO 7218 wordt ook wel gekescherend 'de moeder van alle microbiologische normen' genoemd.

De huidige versie van ISO 7218 met algemene eisen en richtlijnen voor microbiologisch onderzoek is in 2007 uitgebracht en een amendement in 2014. Sindsdien is er veel veranderd ten aanzien van de uitvoering en kwaliteitscontroles van microbiologische analyses. Al in 2013 is, naar aanleiding van de 5-jaarlijkse systematic review, een internationale werkgroep gestart met de eerste verkenningen voor herziening. Gaandeweg is het kleine gezelschap dat zich bezighoudt met de herziening uitgebreid en inmiddels is de (internationale) werkgroep op oorlogssterkte. Vanwege het grote belang voor de (agro)foodsector is de Nederlandse inbreng in de voorbereidende fase via een ad-hoc groep groot.

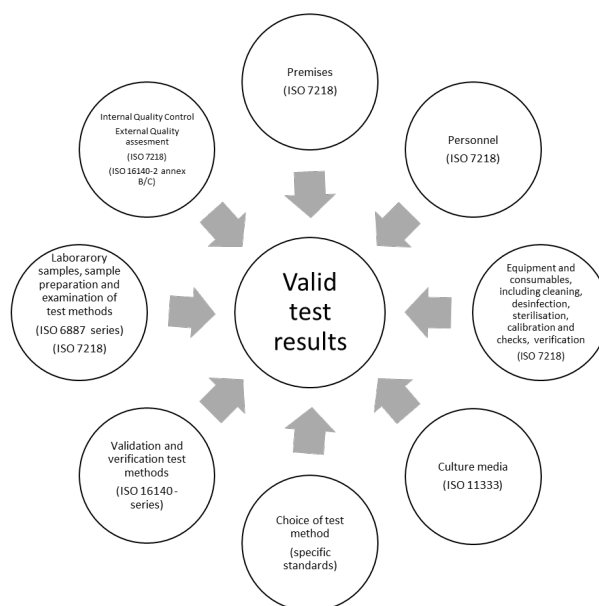
Eind 2019 heeft een stemming plaatsgevonden op basis van de eerste contouren van de nieuwe ISO 7218. Het resultaat is dat ISO de herziening van ISO 7218 als nieuw project heeft opgenomen. Er is nu een formele termijn van 4 jaar (einddatum 16-12-2023) om de norm te publiceren als achtereenvolgens een Working Draft (WD), een Committee Draft (CD), een Draft International Standard (DIS) en een Final Draft International Standard (FDIS).

De stemming heeft plaatsgevonden op basis van het document ISO/NP 7218, het resultaat van bijna 7 jaar praten over aanpassingen van de huidige norm.

Er zijn op het document 269 commentaren ingediend, zowel redactioneel als technisch – inhoudelijk. Op 14 en 15 januari 2020 zijn deze in de internationale werkgroep besproken. De belangrijkste uitkomsten zullen (zo mogelijk) tijdens het FIMM-seminar op 11 februari 2020 worden toegelicht.

Belangrijke aandachtspunten bij de herziening van ISO 7218 zijn de volgende.

- Less is More. ISO 7218 wil niet dupliceren wat in specifieke normen voor analysemethoden is opgenomen, of in wet- en regelgeving (zoals biologische veiligheid). Alleen onderwerpen die toelichting behoeven of heel generiek gelden voor alle microbiologische normen worden opgenomen.
- De leidraad voor de nieuwe ISO 7218 is de Quality Control Circle.
- Er wordt veel aandacht besteed aan het op juiste wijze berekenen van kiemgetallen (strijk- en gietplaten, MPN, inclusief spiral plating).

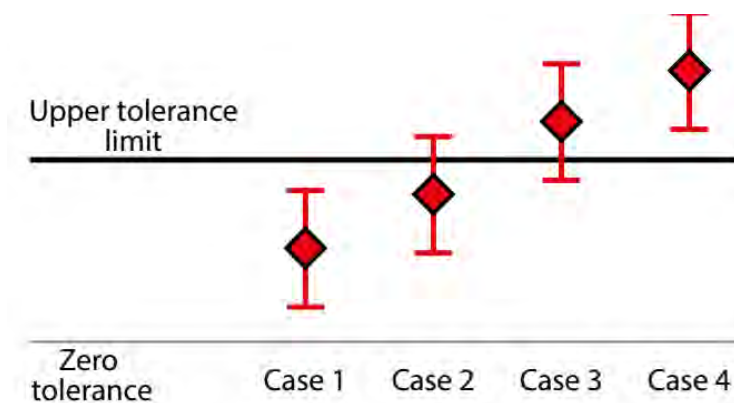


- Er komt een nieuw hoofdstuk voor de selectie en karakterisering van micro-organismen te gebruiken voor laboratorium kwaliteitscontrole
- Het bestaande hoofdstuk 'Quality Assurance' wordt herzien tot een hoofdstuk voor de laboratorium kwaliteitscontrole (Laboratory quality control in microbiology), bestaande uit Internal Quality Control (ICQ) en External Quality Assessment (EQA).
- Er komt een nieuw hoofdstuk voor prestatiekenmerken van microbiologische bepalingen waarin een tabel wordt opgenomen welke kenmerken voor de verschillende analysemethoden relevant zijn.
- Het bestaande hoofdstuk 'Validation of microbiological methods' wordt herzien tot het hoofdstuk 'Validation and verification of microbiological methods'. Er zal zoveel mogelijk worden verwezen naar de ISO 16140 validatie normen.

Een belangrijk aspect van de herziening van ISO 7218 is te zorgen voor goede aansluiting op 'richtlijnen voor de technische vereisten voor accreditatie volgens NEN-EN-ISO/IEC 17025:2018 'Algemene eisen voor de competentie van test- en kalibratielaboratoria'.

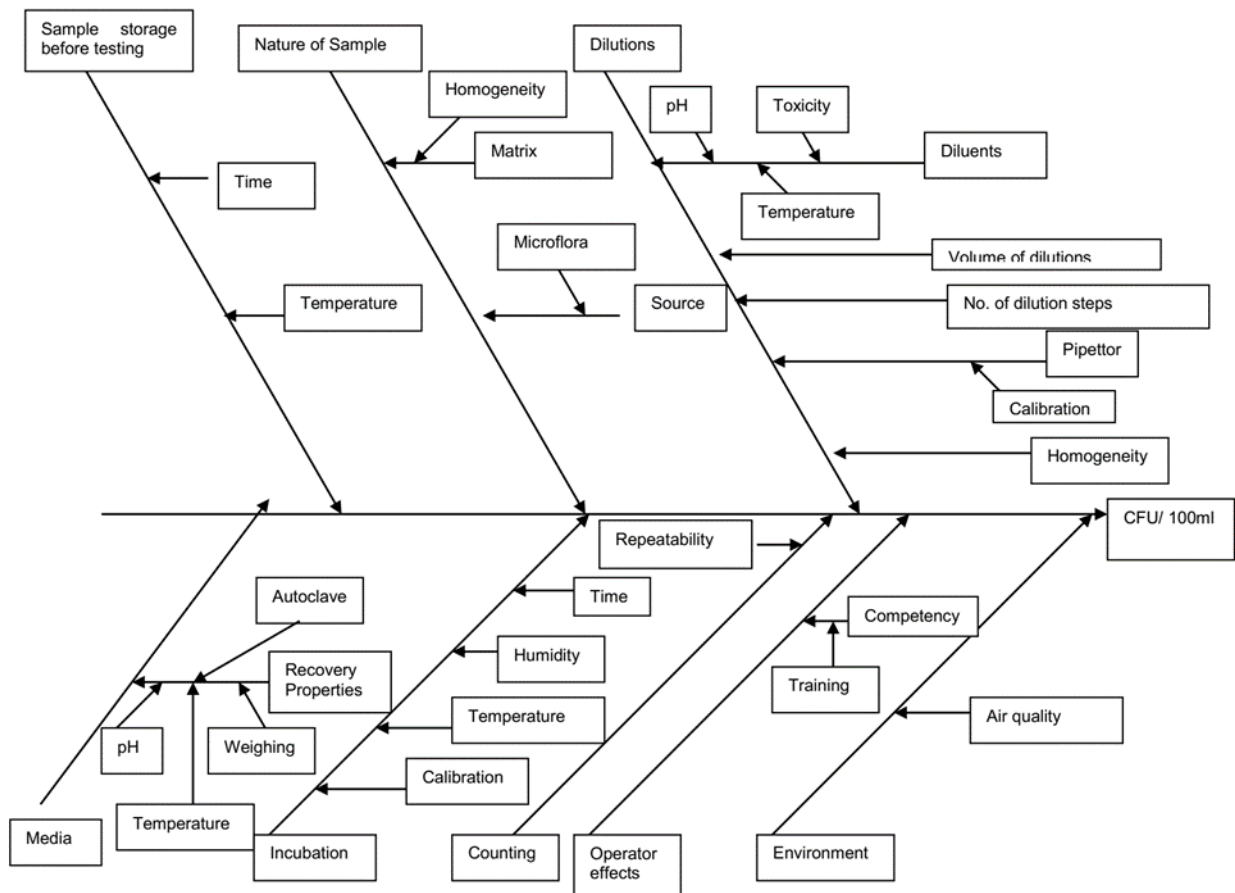
Toelichting herziening ISO 19036

Meetonzekerheid is 'hot' in de levensmiddelen microbiologie. Om een uitspraak te kunnen doen over de betekenis van een resultaat in relatie tot bijvoorbeeld afkeurgrenzen, is het noodzakelijk te weten wat de meetonzekerheid van de bepaling is. In onderstaand voorbeeld is te zien dat in cases 3 en 4 de gemiddelde waarde boven de maximaal toegestane waarde ligt. Echter alleen in case 4 kan met zekerheid (bijvoorbeeld > 99%) worden geconcludeerd dat het resultaat te hoog is. In case 3 kan dit niet worden geconcludeerd.

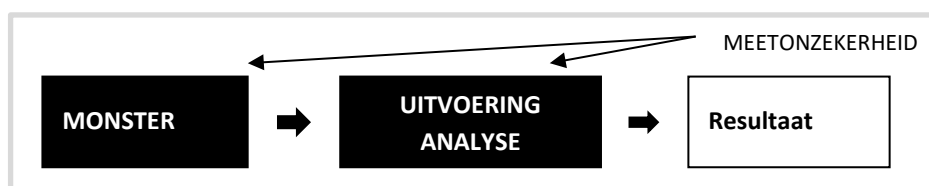


Meetonzekerheid is het gevolg van een complex aan factoren in het traject van monstername tot resultaat en omvat de matrix, de gebruikte materialen, middelen, methoden en zeker niet last but not least, de mens. Zie het figuur op de volgende bladzijde ter illustratie ³ :

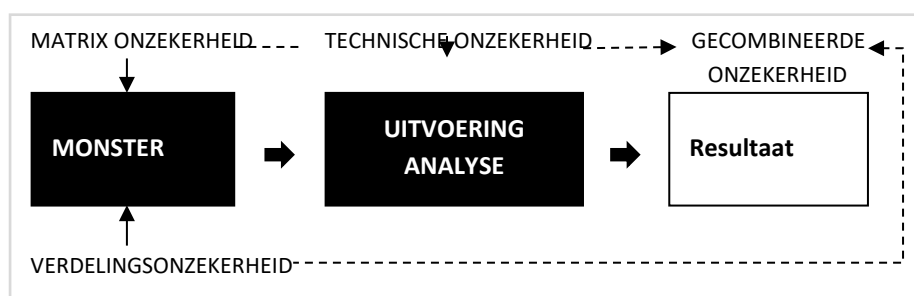
³ Naar: EURACHEM/CITAC Guide CG4 on Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement



De 2006 versie van ISO 19036 maakte gebruik van de black box benadering waarin alleen het uiteindelijk resultaat telt en er geen rekening worden gehouden met de verschillende factoren zoals hierboven geïllustreerd.



ISO 19036 van 2019 benoemd wel een aantal factoren, die zelf weer als black box worden benaderd. Benoemd zijn de technische -, matrix – en verdeling onzekerheid.





De **technische onzekerheid** gaat over de concrete uitvoering van de bepaling en omvat dus de methode, de materialen en middelen en de mens. *Let op*, de technische meetonzekerheid moet per analysemethode worden bepaald en is **onafhankelijk** van de matrix. De technische onzekerheid wordt vastgesteld via reproduceerbaarheid van resultaten. Deze kan men **binnen** het laboratorium bepalen via onderzoek van een monster in meervoud. Deze aanpak is beschreven in ISO 19036. Alternatieve opties zijn het afleiden van de reproduceerbaarheid van **interlaboratorium** studie voor validatie van de methode of van de resultaten van **interlaboratorium** ringonderzoeken.

De **matrix onzekerheid** gaat over de onzekerheid als gevolg van de verdeling van micro-organismen binnen de betrokken matrix. *Let op*, de matrix meetonzekerheid moet per natuurlijk besmet type monster/matrix worden bepaald en is **onafhankelijk** van de methode. Matrix onzekerheid kan worden geschat als de **intralaboratorium** reproduceerbaarheid door meerdere testporties in herhaalbaarheidsomstandigheden te analyseren van een of meer laboratoriummonsters. De norm beschrijft het minimaal benodigde aantal monster, test porties en herhalingen.

De **verdelings onzekerheid** gaat over de willekeurige verdeling van micro-organismen in het testmateriaal. Meestal betreft het een Poisson-verdeling. Deze onzekerheid hoeft niet via onderzoek te worden bepaald omdat deze gemodelleerd kan worden en dus kan worden berekend uit de formule voor de Poisson-verdeling. In de norm zijn tabellen opgenomen waar de verdelingsonzekerheid kan worden afgelezen. Voor de **MPN bepaling** geldt min of meer hetzelfde, echter is de berekening complexer. Gelukkig heeft men een Excel tool ontwikkeld die beschikbaar is op <https://standards.iso.org/iso/7218>.

De **uiteindelijke** gecombineerde onzekerheid wordt via formules berekend uit de technische-, matrix- en verdelingsonzekerheid. De norm geeft een aantal voorbeelden die de ogenschijnlijk complexe materie toch redelijk toegankelijk maken.

FiMM symposium

‘De Toekomst van Voedselveiligheid’

Nieuws uit het (inter)nationale normalisatie netwerk

Drs. Anold Dijkstra

Principal Microbiology CSK food enrichment

lid NEN -, ISO – en IDF normcommissies en werkgroepen

1

Inhoud

- Wat is ISO (waarom normalisatie belangrijk is)?
- Trends in normalisatieland
- Nieuwe normen in 2019 – Verwachten normen in 2020
- Uitgelicht: ISO 19036 – meetonzekerheid
- Uitgelicht: CD ISO 7218 – richtlijnen microbiologisch onderzoek
- Uitgelicht: ISO 7218 vs ISO 17025
- Alle hulp is welkom

11/02/2020

2

2

ORGANISATIES

ACTIEF BIJ NORMALISATIE IN VOEDING



11/02/2020

3

3



11/02/2020

4

4



11/02/2020

5

In Londen komen in 1946 65 afgevaardigden uit 25 **landen** bijeen om de toekomst van International Standaardiseren te bespreken.

In 1947 wordt ISO officieel opgericht met 67 technische commissies (groepen deskundigen die zich richten op een specifiek onderwerp)

5

INTERNATIONAL
STANDARD

ISO
1

Second edition
2002-07-15

Geometrical Product Specifications (GPS) — Standard reference temperature for geometrical product specification and verification

Spécification géométrique des produits (GPS) — Température normale de référence pour la spécification géométrique des produits et vérification

In 1951 wordt de eerste ISO-norm (toen “aanbevelingen” genoemd) gepubliceerd: ISO/R 1:1951 *Standard reference temperature for industrial length measurements*

Sindsdien is deze standaard vele malen bijgewerkt en is nu ISO 1:2002 *Geometrical Product Specifications (GPS) - Standard reference temperature for geometrical product specification*.

11/02/2020

6

6



SI - International System of Units

In 1960 publiceert ISO de standaard ISO 31 voor hoeveelheden en eenheden (die inmiddels is vervangen door *ISO 80000-1:2009 Quantities and units — Part 1: General*)

7

7



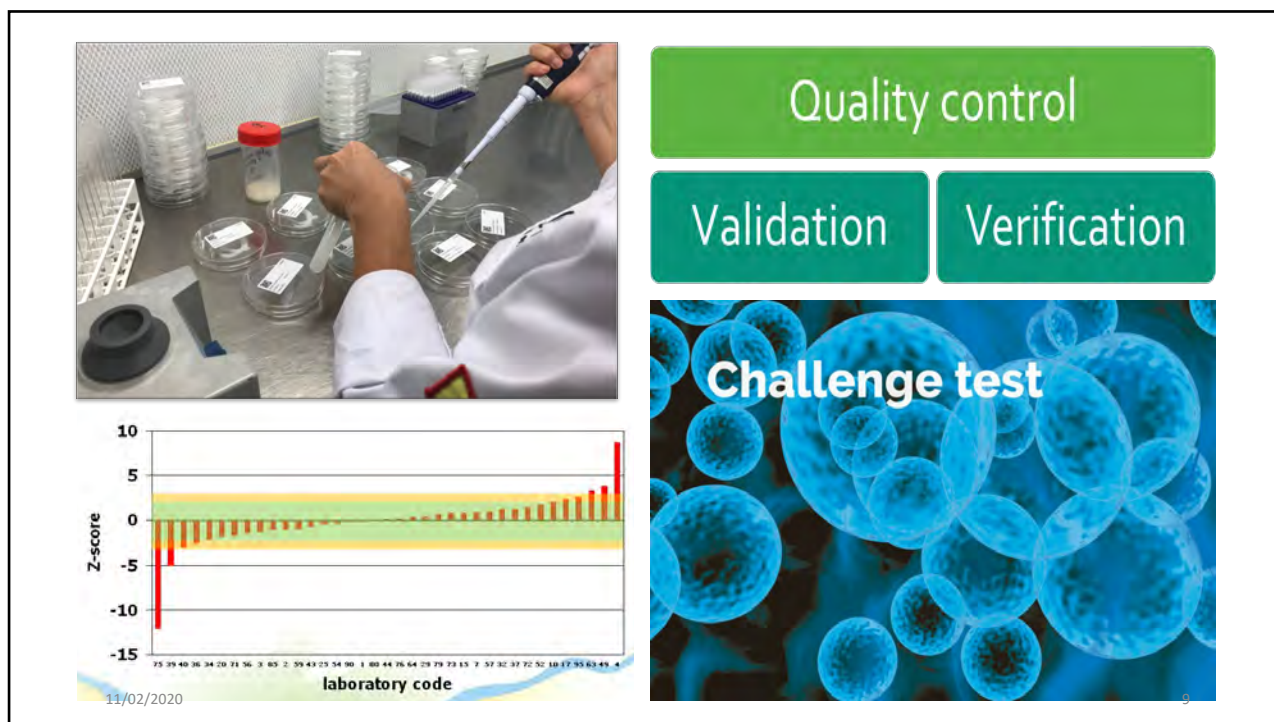
Status 2020

- ISO 's werelds grootste ontwikkelaar van vrijwillige Internationale Standaarden
- (circa) 22919 ISO's gepubliceerd rond bijna alle aspecten van technologie en business bestrijken.
- 164 landen zijn 'actief'
- 160 mensen fulltime in dienst

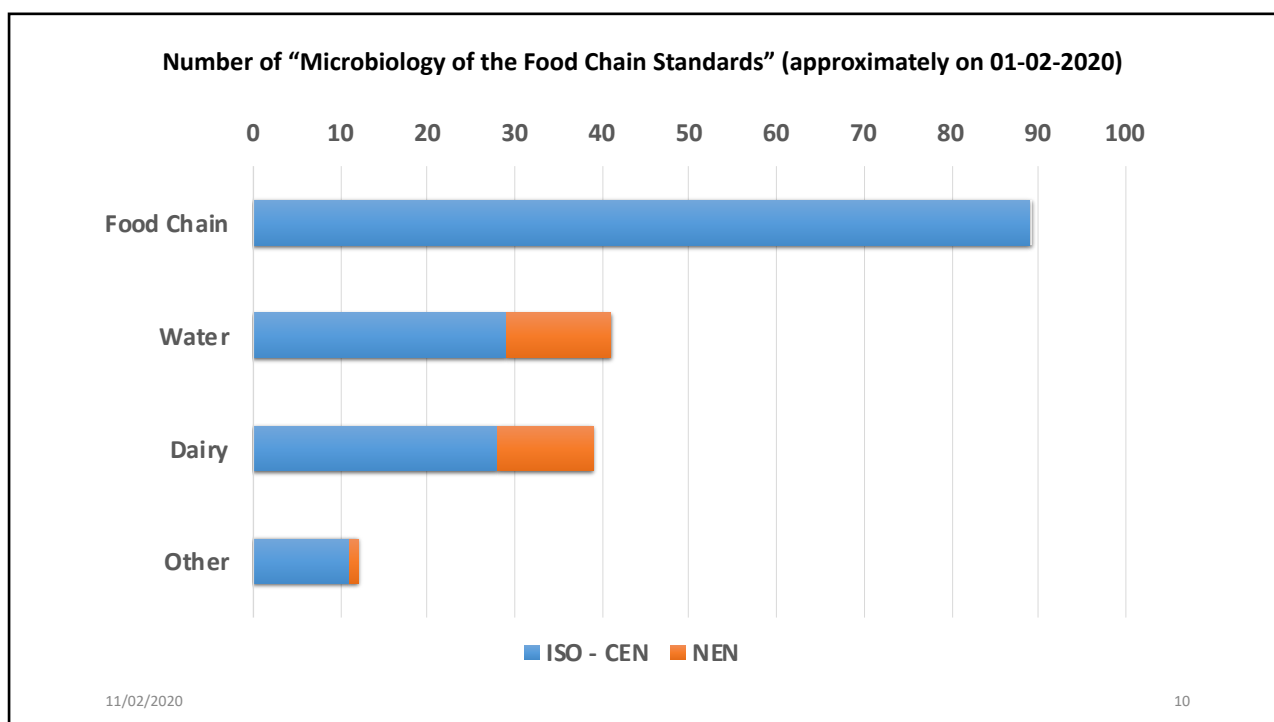
11/02/2020

8

8



9



10

TRENDS IN NORMALISATIELAND

11/02/2020

11

11

Van verticaal



11/02/2020

12

12

naar horizontaal



11/02/2020

13

13

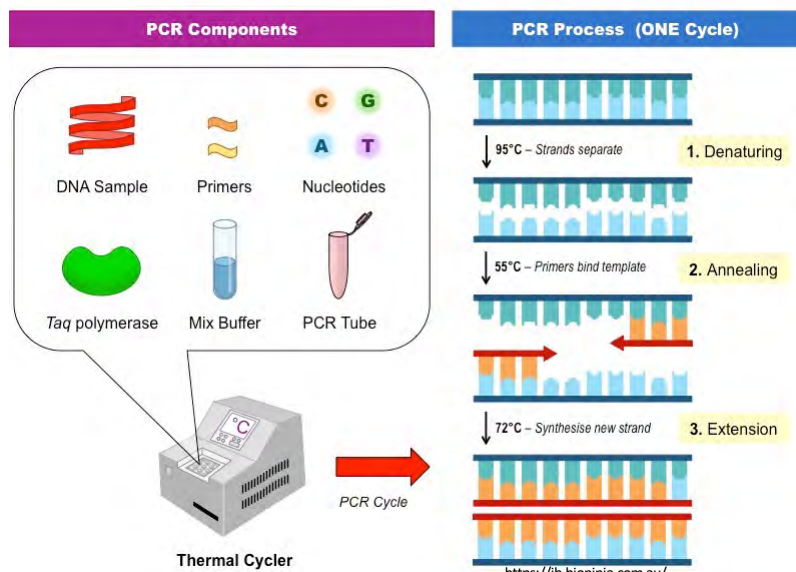
Optimaliseren, bepalen van
prestatiekenmerken



© thinkstock

14

Opkomst van (RT-)PCR

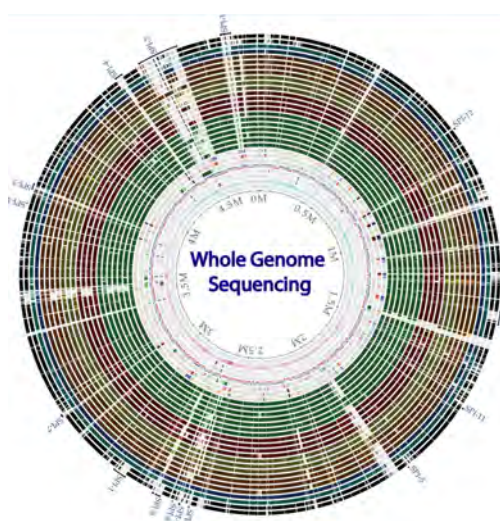


11/02/2020

15

15

Whole Genome Sequencing



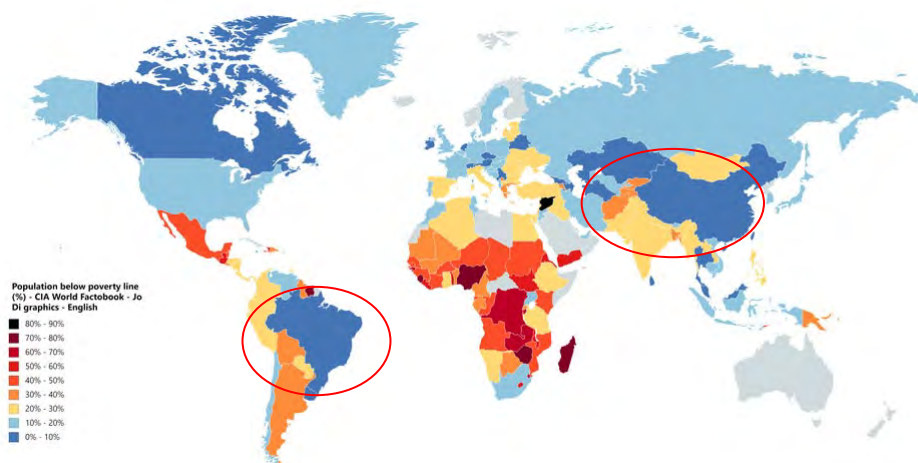
11/02/2020



16

16

Steeds meer landen actief bij internationale normalisatie



11/02/2020

Created with mapchart.net ©

17

17

GEPUBLICEERDE NORMEN 2019

11/02/2020

18

18

ISO 16297	Revised	2020	Milk – Bacterial count - Protocol for the validation of alternative methods
ISO 7870-1	Revised	2019	Control charts - Part 1: General guidelines
ISO 12869	TS - Revised	2019	Water quality - Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)
ISO 15216-2	New	2019	Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection
ISO 16140-6	New	2019	Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures
CEN/TS 17329-1	New	2019	Voedingsmiddelen - Algemene richtlijnen voor de validatie van kwalitatieve real-time PCR methoden - Deel 1: Validatie in een enkel laboratorium
CEN/TS 17329-2	New	2019	Voedingsmiddelen - Algemene richtlijnen voor de validatie van kwalitatieve real-time PCR methoden - Deel 2: Interlaboratoriumonderzoek

11/02/2020

19

19

ISO 16297	Revised	2020	Milk – Bacterial count - Protocol for the validation of alternative methods
ISO 7870-1	Revised	2019	Control charts - Part 1: General guidelines
ISO 12869	TS - Revised	2019	Water quality - Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)
ISO 15216-2	New	2019	Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection
ISO 16140-6	New	2019	Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures
CEN/TS 17329-1	New	2019	Voedingsmiddelen - Algemene richtlijnen voor de validatie van kwalitatieve real-time PCR methoden - Deel 1: Validatie in een enkel laboratorium
CEN/TS 17329-2	New	2019	Voedingsmiddelen - Algemene richtlijnen voor de validatie van kwalitatieve real-time PCR methoden - Deel 2: Interlaboratoriumonderzoek

11/02/2020

20

20

ISO 16297	Revised	2020	Milk – Bacterial count - Protocol for the validation of alternative methods
ISO 7870-1	Revised	2019	Control charts - Part 1: General guidelines
ISO 12869	TS - Revised	2019	Water quality - Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)
ISO 15216-2	New	2019	Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection
ISO 16140-6	New	2019	Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures
CEN/TS 17329-1	New	2019	Voedingsmiddelen - Algemene richtlijnen voor de validatie van kwalitatieve real-time PCR methoden - Deel 1: Validatie in een enkel laboratorium
CEN/TS 17329-2	New	2019	Voedingsmiddelen - Algemene richtlijnen voor de validatie van kwalitatieve real-time PCR methoden - Deel 2: Interlaboratoriumonderzoek

11/02/2020

21

21

ISO 17410	New (dairy included)	2019	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms
ISO 17995	Revised	2019	Water quality - Detection and enumeration of thermotolerant Campylobacter species
ISO 19036	Revised	2019	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations (Amendment 1: Measurement uncertainty for low counts)
ISO 20976-1	New	2019	Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and maximum growth rate
ISO 22117	Revised	2019	Microbiology of food and animal feeding stuffs - Specific requirements and guidance for proficiency testing by interlaboratory comparison

11/02/2020

22

22

NORMEN IN VOORBEREIDING

2020

11/02/2020

23

23

NEN 6821	Ontwerp AMD1	Gepasteuriseerde melk en vloeibare melkproducten - Aantonen van nabesmetting
NEN 6877	Ontwerp	Melk en melkproducten - Aantonen van sporen van boterzuurbacteriën en bepaling van het gehalte aan sporen van boterzuurbacteriën volgens de MPN-methode
ISO 6579-4	PWI	Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 4: Identification of monophasic Salmonella Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) by polymerase chain reaction (PCR)
ISO 7218	CD	Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations
ISO 7870-7	CD	Control charts — Part 7: Multivariate control charts
ISO 7870-9	FDIS	Control charts — Part 9: Control charts for autocorrelated processes
ISO 15213-1	CD	Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium spp. — Part 1: Enumeration of sulfite-reducing Clostridium spp. by colony-count technique
ISO 15213-2	CD	Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium spp. — Part 2: Enumeration of Clostridium perfringens by colony-count technique
ISO 15213-3	CD	Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Clostridium spp. — Part 3: Detection of Clostridium perfringens

11/02/2020

24

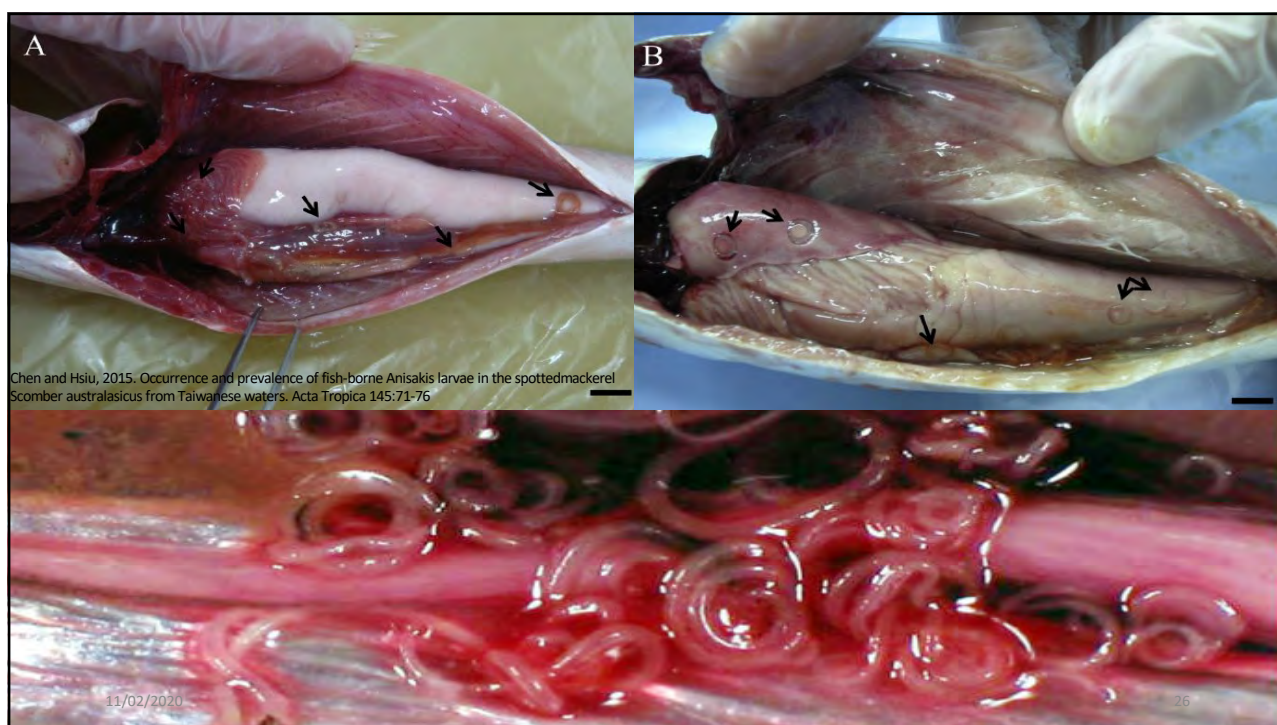
24

ISO 16140-3	FDIS	Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of validated reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
ISO 16140-4	FDIS	Microbiology of the food chain — Method validation — Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory
ISO 16140-5	FDIS	Microbiology of the food chain — Method validation — Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods
ISO 20976-2	WD	Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 2: Challenge tests to study inactivation potential and kinetic parameters
ISO 23036-1	DIS	Microbiology of the food chain — Methods for the detection of Anisakidae L3 larvae in fish and fishery products — Part 1: UV-press method
ISO 23036-2	DIS	Microbiology of the food chain — Methods for the detection of Anisakidae L3 larvae in fish and fishery products — Part 2: Artificial digestion method
ISO 23418	CD	Microbiology of the food chain — Whole genome sequencing for typing and genomic characterization of foodborne bacteria — General requirements and guidance

11/02/2020

25

25



11/02/2020

26

26

UITGELICHT: ISO 19036

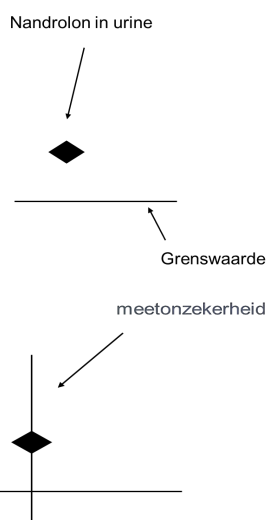
Microbiologie van de voedselketen
Schatting van meetonzekerheid voor kwantitatieve bepalingen

11/02/2020

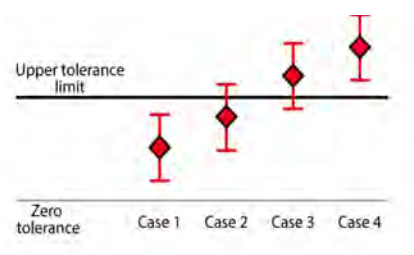
27

27

Waarom is ISO 19036 zo belangrijk?



Meersseman - 2009



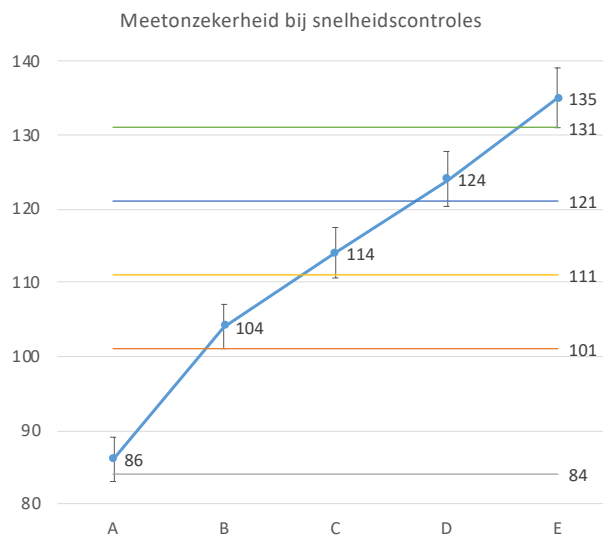
11/02/2020

28

28

Bron: OM.nl

Meetcorrectie (= correctie voor meetonzekerheid)	
< 100 km/u	3 kilometer/uur
Vanaf 100 km/u	3 procent

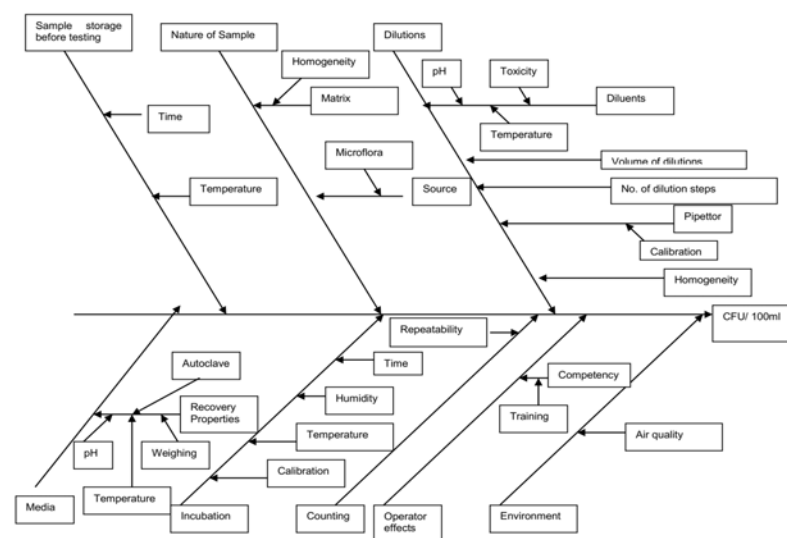


11/02/2020

29

29

Wat veroorzaakt meetonzekerheid?



11/02/2020
Naar: EURACHEM/CITAC Guide G4 on Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement

30

30

ISO-TS 19036: 2007 'Oude benadering' meetonzekerheid



- Per matrix 10 verschillende monsters
- Deze monsters op 10 verschillende dagen inzetten
- Per monster/dag in duplo onder reproduceerbaarheid condities:
 - zelfde lab, verschillende analisten, apparaten, materialen, etc
- Niet voor detectiemethoden / MPN

Relatieve intralaboratorium-reproduceerbaarheids-standaardafwijking

$$RSD_R = 100 * \sqrt{\sum_{i=1}^n \frac{(x_{i1} - x_{i2})^2}{2n}} = \sqrt{Gem(RSD_i)^2}$$

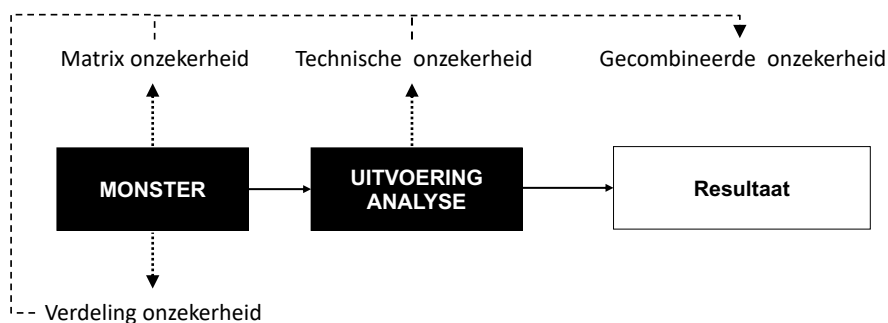
De meetonzekerheid kan afgeleid worden uit: $U = k \cdot RSD_R$ (%)

11/02/2020

31

31

ISO 19036:2019 meetonzekerheid



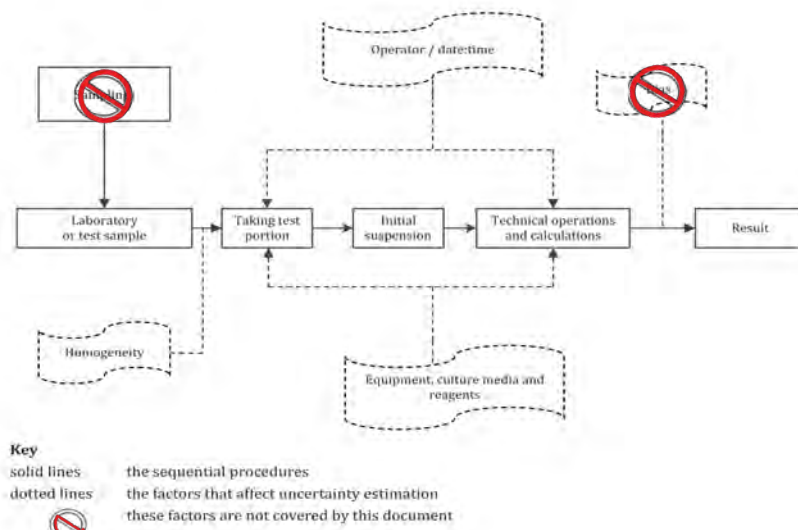
Overall (gecombineerde) meetonzekerheid
 =
Technische & Matrix & Distributie onzekerheid

11/02/2020

32

32

Technische onzekerheid



11/02/2020

33

33

Technische onzekerheid

- Afleiden van de reproduceerbaarheid van een **interlaboratorium** studie t.b.v. validatie
- Afleiden van de reproduceerbaarheid van resultaten van **interlaboratorium** ringonderzoeken
- Vaststellen **intralaboratorium** reproduceerbaarheid van de methode via eigen onderzoek
 - Per analysemethode
 - Onafhankelijk van **de matrix**
 - Minimaal 10 monsters in (minimaal) duplo
 - Reproduceerbaarheid condities
 - Beschreven in ISO 19036

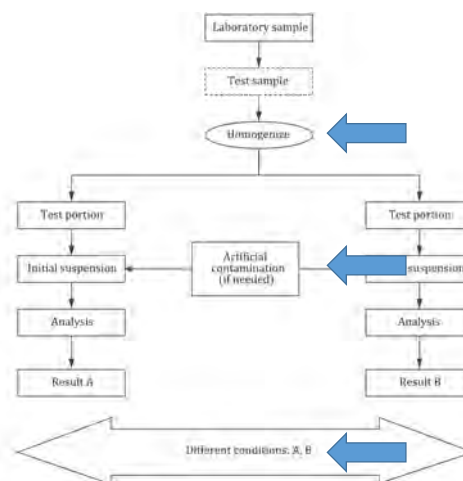


Figure 2 — Experimental protocol for estimation of intralaboratory reproducibility — Two determinations on each laboratory sample

11/02/2020

34

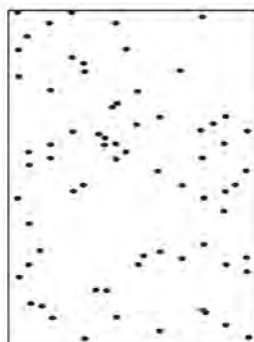
34

Table 1 — Calculation of intralaboratory reproducibility standard deviation — Example of enumeration of aerobic mesophilic flora in mixed poultry meat with one replicate at each of two dilutions tested

Laboratory sample	Test portion	Dilution factors (<i>d</i>) Colonies counted (<i>C</i>)				Total colonies counted	Colony count result in cfu/g or ml weighted mean (see ISO 7218)	$\log_{10}$ cfu/g or ml	Difference $\log_{10}$ cfu	Squared difference
<i>i</i>	<i>j</i>	<i>d</i> ₁	<i>C</i> ₁	<i>d</i> ₂	<i>C</i> ₂	ΣC_{ij}	x_{ij}	$y_{ij} = \log_{10}(x_{ij})$	$y_{iA} - y_{iB}$	$(y_{iA} - y_{iB})^2$
1	A	3	102	4	8	110	$1,0 \times 10^5$	5,000 0		
1	B	3	59	4	4	63	$5,7 \times 10^4$	4,757 9	0,242 1	0,058 6
2	A	5	61	6	6	67	$6,1 \times 10^6$	6,784 7		
2	B	5	66	6	8	74	$6,7 \times 10^6$	6,827 8	-0,043 2	0,001 9
3	A	4	168	5	18	186	$1,7 \times 10^6$	6,228 1		
3	B	4	86	5	7	93	$8,5 \times 10^5$	5,927 1	0,301 0	0,090 6
4	A	5	266	6	25	291	$2,6 \times 10^7$	7,422 5		
4	B	5	140	6	16	156	$1,4 \times 10^7$	7,151 7	0,270 8	0,073 3
5	A	6	45	7	5	50	$4,5 \times 10^7$	7,657 6		
5	B	5	129	6	15	144	$1,3 \times 10^7$	7,117 0	0,540 6	0,292 3
6	A	4	129	5	12	141	$1,3 \times 10^6$	6,107 8		
6	B	4	117	5	10	127	$1,2 \times 10^6$	6,062 4	0,045 4	0,002 1
7	A	2	92	3	8	100	$9,1 \times 10^3$	3,958 6		
7	B	2	131	3	13	144	$1,3 \times 10^4$	4,117 0	-0,158 4	0,025 1
8	A	3	139	4	13	152	$1,4 \times 10^5$	5,140 5		
8	B	3	143	4	15	158	$1,4 \times 10^5$	5,157 3	-0,016 8	0,000 3
9	A	1	49	2	5	54	$4,9 \times 10^2$	2,691 0		
9	B	1	129	2	13	142	$1,3 \times 10^3$	3,110 9	-0,419 9	0,176 3
10	A	4	142	5	13	155	$1,41 \times 10^6$	6,148 9		
10	B	3	227	4	26	253	$2,30 \times 10^5$	5,361 7	0,787 2	0,619 7
sum =										1,340 1
$1,340\ 1 / (2 \times 10) =$										0,067 0
$s_{IR} = \sqrt{0,067} =$										0,258 9
x_{ij} are the calculated colony counts on test portions, e.g. $x_{1B} = 10^{d1} \frac{\Sigma C_{1B}}{1,1} = 10^3 \frac{63}{1,1} = 10^3 \times 57,3 = 5,73 \times 10^4$.										

35

Matrixonzekerheid “simpel”



Willekeurige verdeling.
Voorbeeld:
melk of water

‘Fixed value’ in geval van homogene matrices en
‘verwachte’ minimale matrix onzekerheid.
‘Typically’ $\mu_{\text{matrix}} = 0,1 \log_{10} \text{cfu/ml}$

Het laboratorium heeft voorkennis over te verwachten matrixonzekerheid. Bijvoorbeeld uit voorgaande experimenten. Mag ook van ander laboratorium komen.

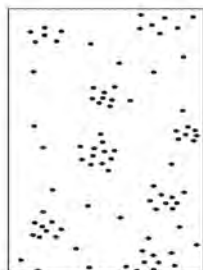


11/02/2020

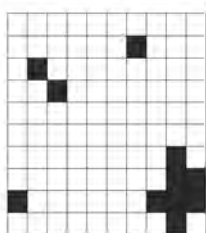
36

36

Matrixonzekerheid “complex(er)”



Gestratificeerde verdeling met clusters en micro kolonies.
Voorbeeld: kaas, stukken vlees, ongesneden groente



Hypothetische verdeling van specifieke micro-organismen in 100 monsters.
Voorbeeld: melkpoeder, gehakt andere complexe en samengestelde voedingsmiddelen



11/02/2020

37

37

Matrixonzekerheid “complex(er)”

Vaststellen **interlaboratorium** reproduceerbaarheid via eigen onderzoek

- Methodiek beschreven in ISO 19036
- 10 monsters in 2-voud (of meervoud) of 1 monster in 11-voud
- Geen kunstmatige besmetting
- **Onafhankelijk** van de **methode**
- **Herhaalbaarheid** condities
- *Onvermijdelijk is enige overschatting wegens technische onzekerheid componenten*

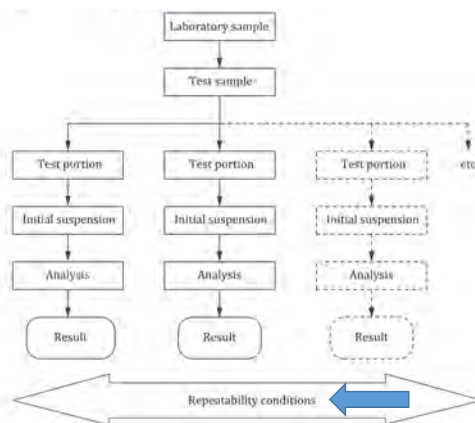


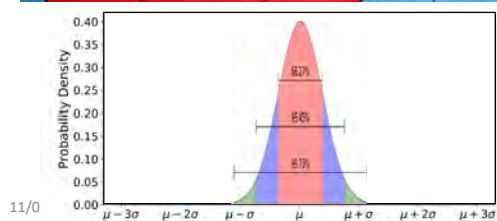
Figure 3 — Experimental design to estimate matrix uncertainty from at least two test portions from each laboratory sample — Design for each laboratory sample

11/02/2020

38

38

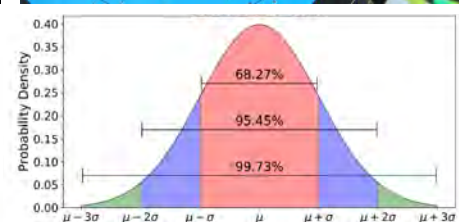
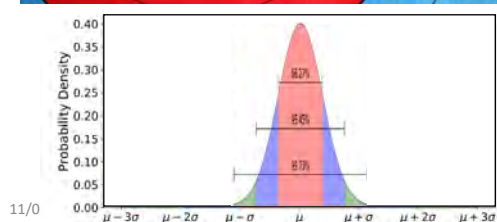
Distributie onzekerheid



39

39

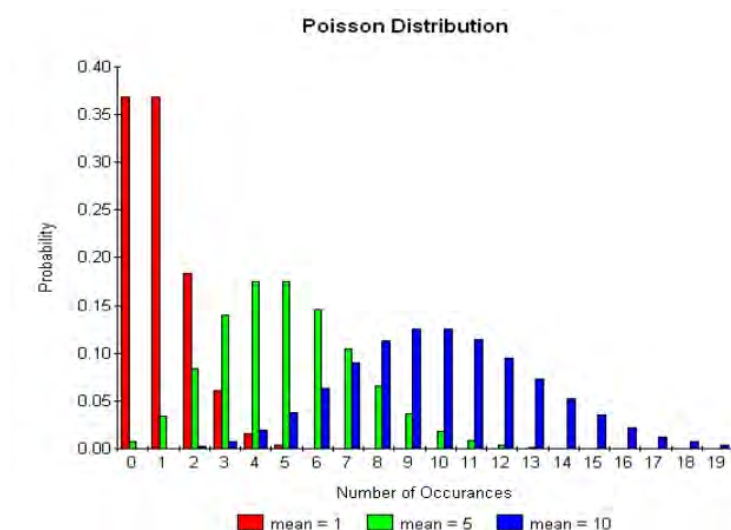
Distributie onzekerheid



40

40

Distributie onzekerheid



11/02/2020

41

41

Distributie onzekerheid

Plaattellingen – Poisson onzekerheid

- Pure statistiek = berekening
- Geen onderzoek nodig
- Waarde hangt samen met aantal getelde kolonies

Table 2 — Values of u_{Poisson} for values of ΣC from 1 to 40

ΣC	u_{Poisson}	ΣC	u_{Poisson}	ΣC	u_{Poisson}	ΣC	u_{Poisson}
1	0,434	11	0,131	21	0,095	31	0,078
2	0,307	12	0,125	22	0,093	32	0,077
3	0,251	13	0,120	23	0,091	33	0,076
4	0,217	14	0,116	24	0,089	34	0,074
5	0,194	15	0,112	25	0,087	35	0,073
6	0,177	16	0,109	26	0,085	36	0,072
7	0,164	17	0,105	27	0,084	37	0,071
8	0,154	18	0,102	28	0,082	38	0,070
9	0,145	19	0,100	29	0,081	39	0,070
10	0,137	20	0,097	30	0,079	40	0,069

11/02/2020

42

42

Distributie onzekerheid

Onzekerheid bevestiging van kolonies

- Bevestiging levert ook bijdrage aan de distributie onzekerheid
- Pure statistiek = berekening
- Geen onderzoek nodig
- Waarde hangt samen met aantal geteste kolonies en aantal positief

Table 3 — Values of confirmation uncertainty (u_{conf}) in $\log_{10}$ for selected values of number colonies tested (n_p) and number of colonies confirmed (n_{cv})

Number of colonies confirmed (n_{cv})	Number colonies tested (n_p)			
	5	10	15	20
1	0,355 4	0,430 2	0,460 5	0,476 9
2	0,202 3	0,262 7	0,286 8	0,299 9
3	0,134 9	0,194 6	0,217 7	0,230 0
4	0,088 8	0,154 1	0,177 6	0,190 0
5	0,045 4	0,125 4	0,150 1	0,162 8

11/02/2020

43

43

Distributie onzekerheid

Onzekerheid MPN bepalingen

- Spreiding lijkt op Poisson onzekerheid ...
- Berekening wel complex(er)
- Gelukkig een Excel tool beschikbaar (gevalideerd door statistici)
- <https://standards.iso.org/iso/7218>

11/02/2020

44

44

MPN calculation program, version 5, dated 2017-01-09, for calculating most probable numbers, their standard deviations, confidence bounds and rarity values.

More information can be found in the following sheets 'Equations & Info' and 'Examples'. For details see: B. Jarvis, C. Wilrich and P.-T. Wilrich, Journal of Applied Microbiology **109**, 2010, 1660-1667. This Excel program is distributed in the hope that it will be useful, but without any warranty. It can be downloaded at: www.wilrich.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/wilrich/index.html. There you have also the possibility to subscribe to a newsletter informing about updates of the program. For assistance contact: wilrich@wilrich.fu-berlin.de.

General data and data for generating the input tables

Name of experiment	Date of experiment	No. of test series	Max. no. of dilutions
ISO 7218	12-12-2016	30	3

Note: A test series / matrix consists of the different dilutions for one target organism / test medium.

Note: The dilution factor d is the dilution ratio used for inoculating the tubes of that row, i.e. 1.0 (undiluted), 0.1 (diluted 1 in 10), etc. The volume v is the volume of the dilution added to each tube in that row.

Input data

Test series 1 / Matrix 1 - Designation: Table C.5, row 1 (3x3)			
Target organism / Test medium:			
Dilution factor d	Volume in ml or g v	No. of tubes n	No. of positive tubes x
1.0	1.0	3	0
0.1	1.0	3	0
0.01	1.0	3	0

Test series 2 / Matrix 2 - Designation: Table C.5, row 2 (3x3)			
Target organism / Test medium:			
Dilution factor d	Volume in ml or g v	No. of tubes n	No. of positive tubes x
1.0	1.0	3	0
0.1	1.0	3	1
0.01	1.0	3	0

Test series 3 / Matrix 3 - Designation: Table C.5, row 3 (3x3)			
Target organism / Test medium:			
Dilution factor d	Volume in ml or g v	No. of tubes n	No. of positive tubes x
1.0	1.0	3	0
0.1	1.0	3	1
0.01	1.0	3	0

Results of the MPN calculations

No.	Test series / Matrix Designation	MPN	$\log_{10}$ MPN	SD $\log_{10}$ MPN	95% confidence limits		Rarity Index	Category
					Lower	Upper		
1	Table C.5, row 1 (3x3)	0			0	1.1	1.000	1
2	Table C.5, row 2 (3x3)	0.30	-0.52	0.43	0.041	2.3	0.087	1
3	Table C.5, row 3 (3x3)	0.36	-0.45	0.44	0.048	2.7	0.087	1
4	Table C.5, row 4 (3x3)	0.72	-0.14	0.31	0.17	3.0	0.021	2
5	Table C.5, row 5 (3x3)	0.74	-0.13	0.31	0.18	3.1	0.021	1
6	Table C.5, row 6 (3x3)	1.1	0.056	0.26	0.35	3.7	0.021	2
7	Table C.5, row 7 (3x3)	0.92	-0.037	0.32	0.21	4.0	1.000	1
8	Table C.5, row 8 (3x3)	1.4	0.16	0.26	0.42	4.8	0.041	2
9	Table C.5, row 9 (3x3)	1.5	0.17	0.27	0.43	5.0	0.026	1
10	Table C.5, row 10 (3x3)	2.0	0.31	0.23	0.69	6.0	0.019	2
11	Table C.6, row 1 (3x5)	0			0	0.66	1.000	1
12	Table C.6, row 2 (3x5)	0.18	-0.74	0.43	0.025	1.3	0.092	1
13	Table C.6, row 3 (3x5)	0.20	-0.70	0.44	0.027	1.5	1.000	1
14	Table C.6, row 4 (3x5)	0.40	-0.40	0.31	0.097	1.6	0.020	2
15	Table C.6, row 5 (3x5)	0.40	-0.39	0.31	0.097	1.7	0.205	1
16	Table C.6, row 6 (3x5)	0.61	-0.21	0.25	0.19	2.0	0.024	2

45

Gecombineerde onzekerheid (meetonzekerheid)

Methods such as ATP where no colonies or cells are counted: $u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2}$.

Colony-count methods, without partial confirmation: $u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{Poisson}}^2}$.

Colony-count methods, with partial confirmation: $u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{Poisson}}^2 + u_{\text{conf}}^2}$.

MPN methods: $u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{MPN}}^2}$.

11/02/2020

46

46

**30th meeting of WG 2 « Statistics »
of ISO/TC 34/SC 9 « Food products – Microbiology »**

6 November 2019

6.3 Promotion of the new version of the standard

➔ WG 2 recommended SC 9 to promote the use of this new version for the international community of food microbiology labs and to explain its approach in a short and simple way, given the complexity of the standard. BL and PiV were willing to draft this text. Promotion and education should be conducted at national level, in particular by WG 2 members in their respective countries.

11/02/2020

47

47

UITGELICHT: CD 7218

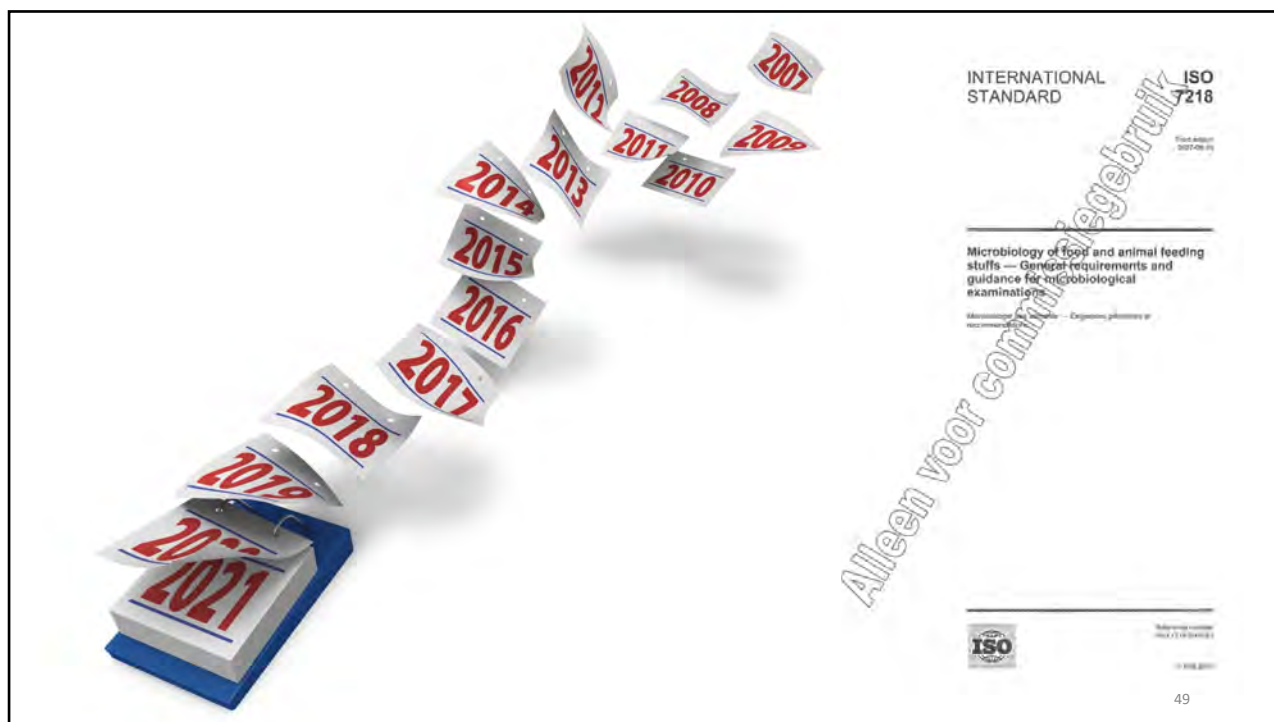
REVISIE VAN ISO 7218

Microbiologie van voedingsmiddelen en diervoeders - Algemene
eisen en richtlijn voor microbiologische onderzoeken

11/02/2020

48

48



49

11/02/2020

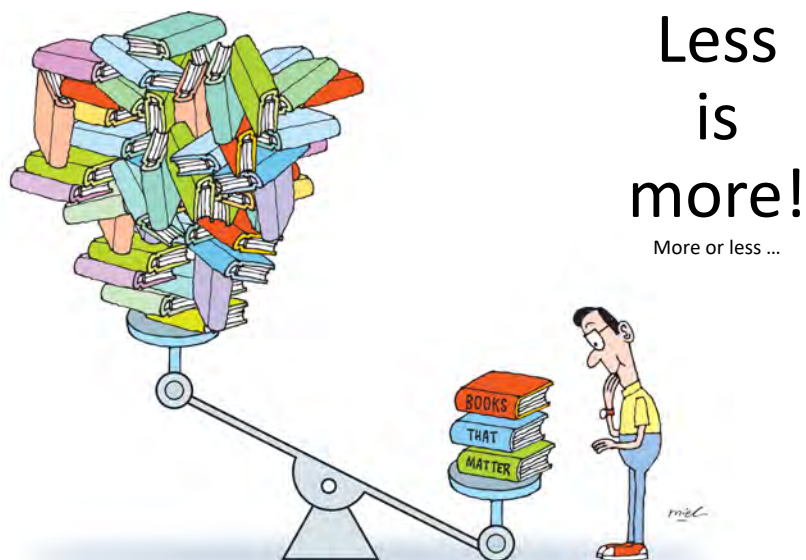
50

ISO 7218:2007 SHOULD BE REVISED

Harry Beckers & Arnold Dijkstra, June 17th 2011

50

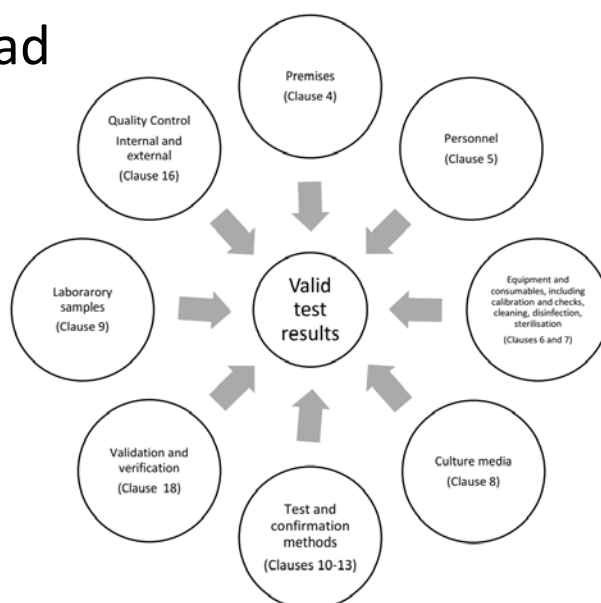
Rode draad



11/02/2020

51

Rode draad



11/02/2020

Figure X: Prerequisites for valid microbiological test results

52

52

ISO 7218 CD

- Zoveel mogelijk **harmoniseren met ISO 8199** (Guidance voor microbiologisch onderzoek water)
- **Risicoanalyse concept** wordt benadrukt. ISO 7218 houdt rekening met de meest voorkomende risico's voor het microbiologische laboratorium. Lokale, individuele risicoanalyses kunnen een aangepaste aanpak vereisen
- WG7 heeft besloten dat DIS ISO 7218 **geen "normatieve referenties"** zal hebben. ISO 7218 is de "top"-standaard, opgezet als een "index" naar andere SC9-normen. Geen andere verwijzingen nodig voor de toepassing ervan!

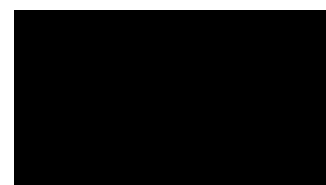
11/02/2020

53

53

ISO 7218 CD

- Juiste wijze berekenen van kiemgetallen (strijk- en gietplaten, MPN, inclusief spiral plating).
- Meer duidelijkheid, ook voor afwijkende situaties.
- Excel tool voor berekening van kiemgetallen (wordt gevalideerd door statistici). Komt ook op <https://standards.iso.org/iso/7218>
- Excel tool geeft ook waarschuwing voor
 - te grote verschillen tussen plaattellingen (uit zelfde verdunning)
 - te grote verschillen tussen plaattellingen (uit opvolgende verdunningen)



11/02/2020

54

54

ISO 7218 – Enumeration tool - draft

DATA								
Initial suspension (-1) : 1/ 10								
Volume/Petri dish [mL] 1								
Dilution	Number of colonies		Colonies to confirm		Confirmed colonies		Final number of colonies	
	Plate A	Plate B	Plate A	Plate B	Plate A	Plate B	Plate A	Plate B
-1	18	35	5	5	4	0	14,4	0
-2	12	2	5	2	3	1	7,2	1
RESULTS								
Number of CFU/g or mL: 1,0E+02								
Is the difference in counts between plates used in parallel at the first dilution acceptable? YES								
Is the difference in counts between plates used in parallel at the second dilution acceptable? NO								
Is the difference in counts between dilutions acceptable? NO								

11/02/2020

55

55

ISO 7218 CD

Er komt een nieuw hoofdstuk(je) voor **de selectie en karakterisering** van micro-organismen te gebruiken voor

- kwaliteitscontrole media
- test (proces) controles
- methode validatie en verificatie
- challenge testen
- ringonderzoeken



11/02/2020

56

56

ISO 7218 CD - Nieuw

- Het bestaande hoofdstuk 'Quality Assurance' wordt herzien tot een hoofdstuk voor de laboratorium kwaliteitscontrole (Laboratory quality control in microbiology), bestaande uit Internal Quality Control (ICQ) en External Quality Assessment (EQA).
- ~~Er komt een nieuw hoofdstuk voor prestatiekenmerken van microbiologische bepalingen waarin een tabel wordt opgenomen welke kenmerken voor de verschillende analysemethoden relevant zijn.~~
- Het bestaande hoofdstuk 'Validation of microbiological methods' wordt herzien tot het hoofdstuk 'Validation and verification of microbiological methods'. Er zal zoveel mogelijk worden verwezen naar de ISO 16140 validatie normen.

11/02/2020

57

57

ISO 7218 – verdere ontwikkeling

februari – april 2020:	Verwerken commentaar op CD in een DIS
Juni 2020:	Verzoek aan SC9 tot uitbrengen van DIS ISO 7218
September 2020:	Start commentaar – stemronde (12 weken)
Q1-2021:	WG7 beoordelen en verwerken commentaar



NEN-EN-ISO 7218-2022
INTERNATIONAL
STANDARD

ISO
7218

Fourth edition
2022-09-01

Microbiology of the food chain —
General requirements and guidance for
microbiological examinations

11/02/2020

58

58

UITGELICHT: 7218 VS 17025

SAMENHANG TUSSEN DEZE BEIDE NORMEN?

11/02/2020

59

59

ISO 17025:2017	ISO 7218:2007	CD ISO 7218:2019
Algemene eisen voor de competentie van test- en kalibratielaboratoria	Algemene eisen en richtlijn voor microbiologische onderzoeken	Algemene eisen en richtlijn voor microbiologische onderzoeken
Stelt kaders - WAT	Vult kaders t.a.v. microbiologisch onderzoek in - HOE	(Nog) Betere aansluiting op ISO 17025 te aanzien van de kaders t.a.v. microbiologisch onderzoek in - HOE
		NB: Geen duplicering van ISO 17025
Risico gebaseerde benadering – minder voorschrijvende eisen	Geen risico gebaseerde benadering	Risico gebaseerde benadering – meer eigen verantwoordelijkheid voor het laboratorium

11/02/2020

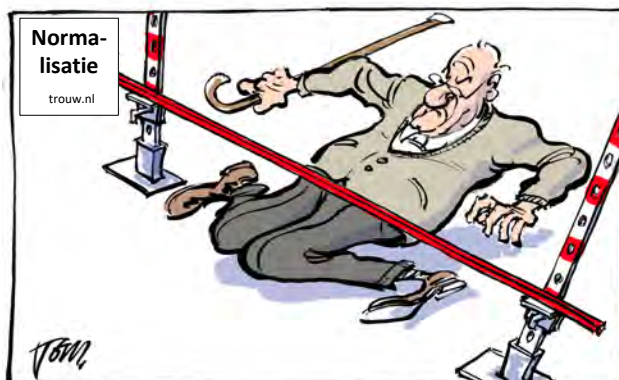
60

60

Normen maken gaat niet vanzelf



11/02/2020



- En ... doet u ook mee?
- "Ook u kunt meepraten over de inhoud van een norm. Via NEN, al 100 jaar hét kennisnetwerk voor normalisatie, werkt u met andere partijen aan nieuwe nationale en internationale normen."

Als u meewerkt aan een nieuwe norm beslist u mee over de inhoud van de afspraken en bent u als eerste geïnformeerd over nieuwe initiatieven.

- meedoen@nen.nl

61

61

Dank u wel voor de
belangstelling

62