

Riktlinjer för kollaborativa avprövningar av mikrobiologiska metoder

Inledning

Under senare år har inom organisationer som EU och Codex lagts ned stort arbete på att ta fram rikt- och gränsvärden. Dessa är avsedda att användas i egenkontroll inom industrin, i den offentliga kontrollen av livsmedel samt vid internationell handel. Vid tillämpning av sådana gränser är det viktigt att ha tillgång till validerade metoder så att man kan lita på analysresultaten.

Enligt ISO/IEC 17025:1999 skall laboratorier i första hand använda erkända standardmetoder. Laboratorierna kan också använda andra metoder men de skall då vara validerade. Det finns således ett stort behov av validerade metoder.

Valideringar av mikrobiologiska metoder är arbetskrävande och därmed kostnadskrävande. Vid planeringen av en validering kan det vara lätt att försöka minska omfattningen av valideringen för att spara kostnader. Det är då viktigt att tänka igenom syftet med valideringen. Nedanstående råd avser validering av referensmetoder såsom NMKL, ISO, CEN.

Referensmetod

Vid validering av en ny eller omarbetad metod skall denna jämföras med en referensmetod, om sådan finnes. Vanligtvis väljes NMKL- eller ISO/CEN-metoder.

Laboratorier

Det är väsentligt att antalet laboratorier blir tillräckligt stort för att statistiskt hållbara resultat skall kunna erhållas. Försök att engagera 10-12 laboratorier. 8 laboratorier med användbara resultat krävs. I speciella fall då mycket dyr utrustning används kan antalet laboratorier dock minskas till fem. Laboratorierna bör kontaktas och instrueras i god tid. Kontrollera gärna att laboratorierna uppgiften och är väl insatta i metodiken. Ofta kan det vara relevant att sända ut övningsprov före den verkliga valideringen.

Val av matriser

Val av matriser beror på vad metoden skall valideras för.

Om metoden skall valideras för ett livsmedel, exempelvis *Campylobacter* i kyckling, räcker en matris.

Om metoden däremot skall valideras för livsmedel i allmänhet måste antalet matriser ökas. AOAC anger minst 6 matriser. Dessa bör då representera livsmedel som vanligen analyseras på den mikroorganism som ingår i valideringen. Matriserna bör om möjligt tas ur olika livsmedelsgrupper såsom köttprodukter, vegetabilier, mejeriprodukter och fisk. Om foder skall ingå i valideringen skall också ett tillräckligt antal foderprodukter av olika typer ingå.

Värdefull hjälp vid val av matriser kan erhållas från Nordvaldokumenten NV-DOC. F 2000-01-01 samt Food Matrices for Salmonella, Listeria, *Campylobacter* och *E. coli* O157. Information om val av livsmedelstyper finns också i ISO 16140 Annex B.

Val av testorganismer

Det är ofta svårt att få tag i naturligt kontaminerade livsmedel med jämn fördelning av mikroorganismerna. Man är därför oftast hänvisad till att spika (kontaminera) livsmedel. De mikroorganismer som skall användas bör vara isolerade från den typ av matris som skall användas i valideringen. De bör vidare vara väl karakteriserade. Det kan vidare vara rekommendabelt att undvika äldre stamkollektionsorganismer som kan ha förlorat karakteristiska egenskaper. Vid val av organismer bör man också tänka på om speciella serotyper eller toxinbildare skall väljas.

Mikroorganismer i processade livsmedel är stressade. Således bör även de mikroorganismer som används för spikning utsättas för stress. Råa, ej processade livsmedel, kan ympas med ostressade mikroorganismer. Vid kylförvarade varor kan eventuellt köldstressade mikroorganismer användas. Frystorkade organismer används ofta vid spikning av torra produkter såsom pulverprodukter, granulat och liknande.

Vid all spikning av prov skall man försäkra sig om att mikroorganismen som skall analyseras är jämnt fördelad i proven så att inte variationer mellan proven påverkar resultatet av valideringen.

Halter av mikroorganismer och kontroller

Vid validering av kvalitativa metoder spikas proven dels med halter som ligger nära detektionsgränsen för testmetoden exempelvis 1-5 cfu per 25 gram dels med halter på 10-50 cfu per 25 gram.

Vid validering av kvantitativa metoder framställs för varje typ av livsmedel prov med tre olika halter samt ett ospikat kontrollprov.

Den lägsta halten skall ligga nära detektionsgränsen hos den validerade metoden och de andra halterna kan ligga en respektive två tiopotenser högre.

Behandling av data

Ingående redogörelser för hur man gör statistiska beräkningar vid värdering av kvantitativa metoder finns i Youden och Stainer 1987. Vidare kan Nordval 2005 och AOAC 2002 ge värdefull information för behandling av data.

Kvalitativa valideringar

Värdera vilka data från de olika laboratorierna som är användbara. Resultat från minst 8 laboratorier måste kunna användas för de följande beräkningarna. Som tidigare nämnts kan resultat från 5 laboratorier accepteras i speciella fall.

Beräkna Relative accuracy, Relative sensitivity och Relative specificity se Nordval 2005.

Kvantitativa valideringar

Värdera vilka data från de olika laboratorierna som är användbara. Se under Kvalitativa valideringar. Beräkna standardavvikelse för repeterbarheten (Sr), den relativa standardavvikelsen för repeterbarheten (RSD r), repeterbarhetsgränsen (r), standardavvikelsen för reproducerbarheten (SR), den relativa standardavvikelsen för reproducerbarheten (RSD R) samt reproducerbarhetsgränsen (R).

Bedömning av resultat

Det är svårt att fastställa kriterier för vad metoder skall prestera. Vad som krävs av metoder beträffande känslighet och noggrannhet är beroende av syftet med analyserna. I litteraturen är det också svårt att finna förslag på kriterier som metoder bör uppfylla. Nordval har dock i Protocol for validation of alternative microbiological methods angett att den relativa känsligheten hos en alternativ metod bör vara minst 95%.

Den validerade metoden bör uppvisa spridningsvärden som är lika bra eller bättre än den använda referensmetoden. Vidare bör valideringsresultaten för olika livsmedelskategorier inte skilja sig åt avsevärt.

Resultaten av en validering bör bedömas i förhållande till det sammanhang i vilket metoden skall användas. I vissa fall kan en metod med mindre känslighet eller noggrannhet men som är billig och snabb vara användbar då det gäller att screena stora mängder prov.

Litteratur

(1) ISO/IEC 17025 (2005) General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

(2) EN ISO 16140 (2003) Protocol for validation of alternative microbiological methods

(3) Nordval (2005) Protocol for validation of alternative microbiological methods

(4) AOAC (2002) International methods committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis

(5) Youden, W.J. and Stainer, E.H., (1987) Statistical Manual of the Association of Official Chemists Qualitative and Quantitative Checklist

Utarbeidet av:

Per Norberg (prosjektleder) (SE), Sven Qvist (DK), Tuula Johansson (FIN) og Gro S. Johannessen (NO)