

## **Validering av hurtigmetode for kvantifisering av gjær og mugg - Petrifilm Rapid Yeast and Mold (RYM) Count Plate**

Halvor Nygaard





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 350 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

**Hovedkontor Tromsø:**

Muninbakken 9–13  
Postboks 6122 Langnes  
NO-9291 Tromsø

**Ås:**

Osloveien 1  
Postboks 210  
NO-1433 ÅS

**Stavanger:**

Måltidets hus, Richard Johnsen gate 4  
Postboks 8034  
NO-4068 Stavanger

**Bergen:**

Kjerreidviken 16  
Postboks 1425 Oasen  
NO-5844 Bergen

**Sunndalsøra:**

Sjølsengvegen 22  
NO-6600 Sunndalsøra

**Alta:**

Kunnskapsparken, Markedsgata 3  
NO-9510 Alta

**Felles kontaktinformasjon:**

Tlf: 02140

E-post: [post@nofima.no](mailto:post@nofima.no)

Internett: [www.nofima.no](http://www.nofima.no)

**Foretaksnr.:**

**NO 989 278 835 MVA**

# Rapport

<p><i>Tittel:</i> <b>Validering av hurtigmetode for kvantifisering av gjær og mugg - Petrifilm Rapid Yeast and Mold (RYM) Count Plate</b></p>	<p>ISBN: 978-82-8296-530-9 (pdf) ISSN 1890-579X</p>
<p><i>Title:</i> Validation of a rapid method for enumeration of yeast and mold – Petrifilm Rapid Yeast and Mold (RYM) Count Plate</p>	<p><i>Rapportnr.:</i> 32/2017</p>
<p><i>Forfatter(e)/Prosjektleder:</i> Halvor Nygaard</p>	<p><i>Tilgjengelighet:</i> <b>Åpen</b></p>
<p><i>Avdeling:</i> BioLab</p>	<p><i>Dato:</i> 18.12.2017</p>
<p><i>Oppdragsgiver:</i> Nofima AS - Bergen</p>	<p><i>Ant. sider og vedlegg:</i> 10</p>
<p><i>Stikkord:</i> Mugg, gjær, validering, måleusikkerhet</p>	<p><i>Oppdragsgivers ref.:</i></p>
<p><i>Sammendrag/anbefalinger:</i></p>	
<p>Metodens riktighet og presisjon ble vurdert som tilfredsstillende, basert på ekstern kollaborativ validering og intern verifisering av riktighet og presisjon.</p>	
<p><b><u>Riktighet</u></b></p>	
<p>Analyser av referansemateriale med ny metode (RYM), ga for gjær resultater sentralt i oppgitt initialt kontroll-intervall, mens mugg plasserte seg ved nedre kontrollgrense. Årsaken til lave muggresultater kan være tap av viabilitet etter fryselagring av referansemateriale i opptil 4 år.</p>	
<p>Analyser av naturlig kontaminerte prøver med ny metode (RYM) ga tilsvarende resultater som Nofimas etablerte metode (YM) for både mugg og gjær.</p>	
<p>AOACs og AFNORs kollaborative avprøvinger av RYM ga resultater for både mugg og gjær som ikke skilte seg statistisk fra resultatene av referansemetodene (US FDA BAM og ISO 21527).</p>	
<p><b><u>Presisjon</u></b></p>	
<p>Måleusikkerhet (U) for RYM ble beregnet til 0,12 for gjær og 0,23 for mugg som er lik eller noe lavere enn tidligere estimater for YM.</p>	
<p>AOACs og AFNORs interlaboratorie-studier konkluderte med at repeterbarhet og reproduserbarhet for RYM var tilsvarende som for referansemetodene (US FDA BAM og ISO 21527).</p>	
<p><i>English summary/recommendation:</i></p>	
<p>The report summarizes the validation of a new rapid method for enumeration of molds and yeasts; Petrifilm Rapid Yeast and Mold (RYM) Count Plate.</p>	

## **Innhold**

<b>1</b>	<b>Bakgrunn .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Behov for intern validering av metoden.....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Valideringsplan .....</b>	<b>3</b>
3.1	Riktighet.....	3
3.2	Presisjon .....	3
<b>4</b>	<b>Materialer og metoder .....</b>	<b>4</b>
4.1	Referansematerialer.....	4
4.2	Ordinære prøver.....	4
4.3	Analysemetoder .....	4
<b>5</b>	<b>Resultater og diskusjon .....</b>	<b>5</b>
5.1	Riktighet.....	5
5.2	Presisjon .....	7
<b>6</b>	<b>Konklusjon .....</b>	<b>10</b>
<b>7</b>	<b>Referanser .....</b>	<b>10</b>

# 1 Bakgrunn

Laboratoriet har erfaring med analyse av gjær og mugg ved hjelp av Petrifilm Yeast and Mold (YM) Count Plate siden 1995. Metoden ble AOAC-validert i 1997 for kvantifisering av gjær og mugg i næringsmidler (J. AOAC Int Vol 80 (4)). Laboratoriet gjennomførte egen validering av metoden i 2011 og fikk metoden akkreditert på det grunnlaget i 2012.

I 2014 fikk Petrifilm Rapid Yeast and Mould (RYM) Count Plate status som «AOAC Official Method of Analysis» (J. AOAC Int Vol 98 (3)) for næringsmidler og NF Validation fra AFNOR for næringsmidler, kjæledyrfôr, dyrefôr og miljøprøver (Certificate: 3M 01/13-07/14).

RYM-metoden skiller seg fra YM-metoden ved at det brukes kortere inkuberingstid (2,5 - 3 dager vs. 5 dager) og høyere inkuberingstemperatur (25 – 28 °C vs. 20 - 25 °C). RYM anvender også en ny indikator-teknologi som forenkler avlesing ved å hemme spredning og overlapping av muggkolonier. Forøvrig er analyseoppsett og -avlesning for de to metodene identisk.

Laboratoriet ønsker å gå over til RYM-metoden på grunn av kortere analysetid og forenklet avlesning.

## **2 Behov for intern validering av metoden**

Metoden er AOAC-validert i en kollaborativ avprøving ved sammenligning med referansemethodene US FDA BAM og ISO 21527 part 1 ( $a_w > 0,95$  produkter) og part 2 ( $a_w \leq 0,95$  produkter). Det ble ikke funnet signifikante forskjeller mellom RYM og referansemethodene. Det ble heller ikke funnet statistiske forskjeller mellom prøver analysert ved 25 og 28 °C eller ved inkubering i 48 og 60 timer.

Metoden er også AFNOR validert i en kollaborativ utprøving organisert av ekspertlaboratoriet ADRIA Development ved sammenligning med ISO 21527 part 1 og 2. Resultatene oppfyller kravene til samsvar som er gitt i valideringsprotokollen EN ISO 16140. Det ble heller ikke her funnet statistiske forskjeller mellom prøver analysert ved 25 og 28 °C eller inkubert i 60 og 72 timer.

I følge NMKL prosedyre nr 4 trengs kun intern verifisering av metodens riktighet og presisjon når metoden er eksternt validert i kollaborativ avprøving.

## **3 Valideringsplan**

### **3.1 Riktighet**

Oppsett og resultatavlesing i RYM er identisk med metoden (YM) som laboratoriet har benyttet sammenhengende siden 1995. Denne metoden har prestert godt i SLVs interkalibreringer siden 1995 (til sammen ca 70 prøver) og vi anser derfor at sammenligning av resultater fra de to metodene er et godt mål på den nye metodens riktighet.

- Analysere referansemateriale med ny (RYM) og eksisterende (YM) metode, sammenligne resultatene innbyrdes og kontrollere om resultatene ligger innenfor oppgitte kontrollgrenser.
- Analysere ordinære prøver med ny (RYM) og eksisterende (YM) metode, sammenligne resultatene innbyrdes.

### **3.2 Presisjon**

- Alle analytikere på mikrobiologisk laboratorium gjennomfører 10 parallellanalyser av referansematerialer i ulike naturlige matrikser. Metodens måleusikkerhet estimeres som intern reproducerbarhet ( $S_R$ ) og utvidet måleusikkerhet (U).

## 4 Materialer og metoder

### 4.1 Referansematerialer

#### SLV 2013:7

Mugg: *Penicillium verrucosum*, *Rhizopus stolonifera*, *Cladosporium cladosporioides*

Gjær: *Kluyveromyces marxianus*

#### SLV 2013:8

Mugg: *Penicillium roquefortii*, *Cladosporium cladosporioides*

Gjær *Saccharomyces cerevisiae*

#### SLV 2015:12

Mugg: Ingen

Gjær: *Candida sp.*

Bakterier: *Micrococcus sp.*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. perfringens*, *E. faecalis*, *B. cereus*

### 4.2 Ordinære prøver

(naturlig mugg/gjær-kontaminerte prøver av fôr- og næringsmidler)

Nofima nr 2017-0118-02, Proteinkonsentrat, IBC 829

Nofima nr 2017-0118-06, Proteinkonsentrat, IBC 1137

Nofima nr 2017-0118-09, Proteinkonsentrat, IBC 1204

Nofima nr 2017-0118-12, Proteinkonsentrat, IBC 1237

Nofima nr 2017-1291-01, Fiskefôr

### 4.3 Analysemetoder

**Etablert metode** (i kontinuerlig bruk i laboratoriet siden 1995)

3M Petrifilm REF: 6407, Yeast and Mold Count Plate (YM)

Inkubering ved 20 - 25 °C i 5 døgn

**Ny metode**

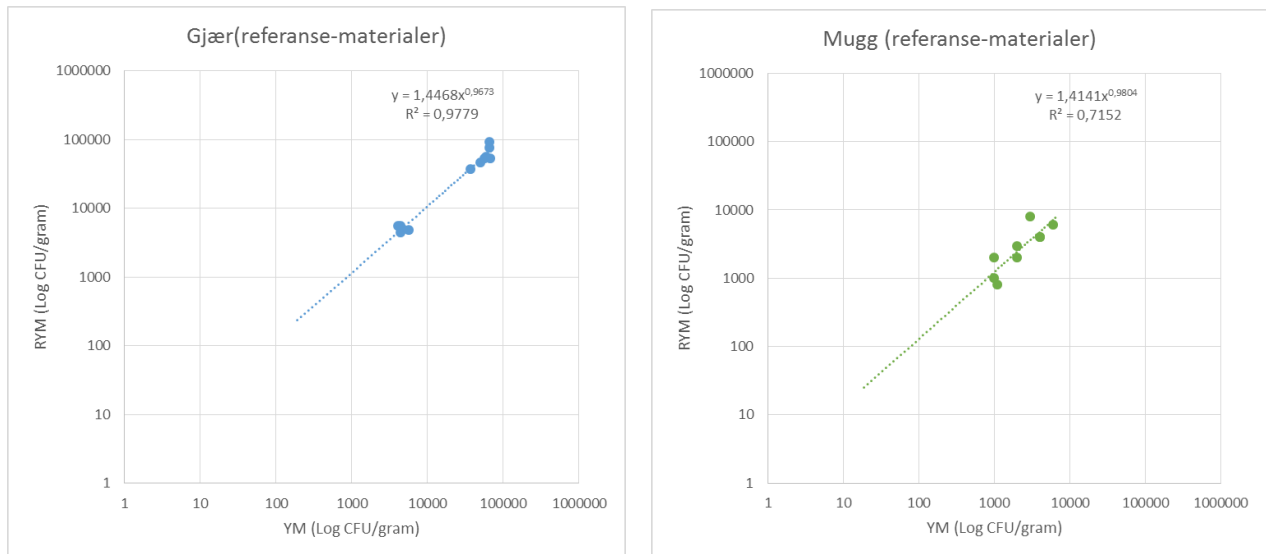
3M Petrifilm REF: 6475, Rapid Yeast and Mold Count Plate (RYM)

Inkubering ved 25 - 28 °C i 3 døgn



## 5 Resultater og diskusjon

### 5.1 Riktighet



Figur 1 Analyse av referansmaterialer (SLV 2013:7, SLV 2013:7+SLV 2015:12, SLV 2013:8 + SLV 2015:12) med ny metode (RYM) og etablert metode (YM). Inkuberingstiden for RYM måtte utvides fra 3 til 5 dager for å få tellbare mugg-kolonier.

Resultater ved analyse av referansmaterialer med ny (RYM) og etablert (YM) metode;

#### Gjær

Det er godt samsvar mellom resultatene fra de to metodene (Fig. 1), resultatene ligger også sentralt i SLVs oppgitte kontrollintervall (Tabell 1).

AOACs og AFNORs valideringer konkluderte med tilfredsstillende samsvar mellom resultatene av RYM og referansmetodene.

#### Mugg

Muggkoloniene på RYM var lite utviklet etter inkubering i 3 døgn og filmene ble derfor inkubert i ytterligere 2 døgn for å få frem tydelige kolonier. Muggresultatene fra de to metodene samsvarte da godt innbyrdes, men begge plasserte seg på eller noe under SLVs nedre kontrollgrense (Tabell 2). R-kvadrert verdi ( $R^2$ ) for trendlinjen er relativt lav (Fig 1) fordi storvokste kolonier gjorde det nødvendig å basere resultatberegning på filmer med svært få (< 10) kolonier.

At mugg-analysene trengte forlenget inkubering kan skyldes egenskapene til stammene som inngår i SLVs referanseprøver. Stammene som ble brukt i AOACs og AFNORs valideringer var til sammenligning tellbare på RYM etter 3 dager eller mindre. AOACs kollaborative validering benyttet stammen *Aspergillus aculeatus* som ga samme resultater som referansmetodene (FDA BAM og ISO 21527) uansett inkuberingsforhold (2 - 3 dager og 25 - 28 °C). Også AFNORs metodesammenligning

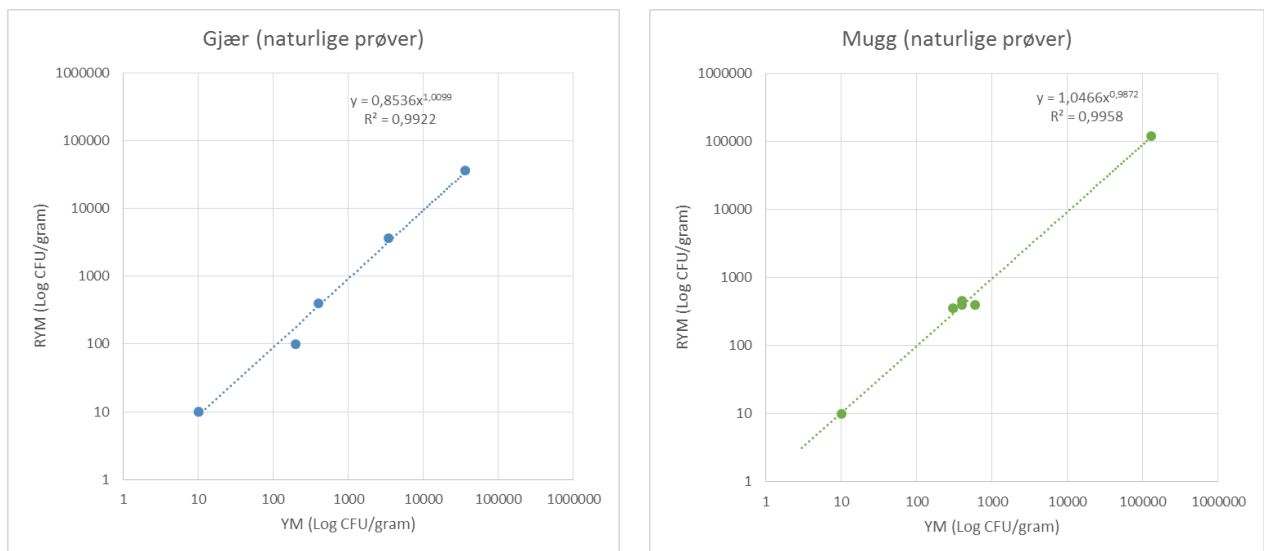
som benyttet 8 matrikser og 8 ulike organismer konkluderte med tilfredsstillende samsvar mellom RYM og referansemetodene uansett inkuberingsforhold (60 - 72 timer og 25 - 28 °C).

Årsaken til lave muggresultater fra både RYM og YM kan være at referansekulturene har redusert vitalitet etter opptil 4 års fryselagring. (Alle referansekulturene var innenfor men på slutten av oppgitt holdbarhet).

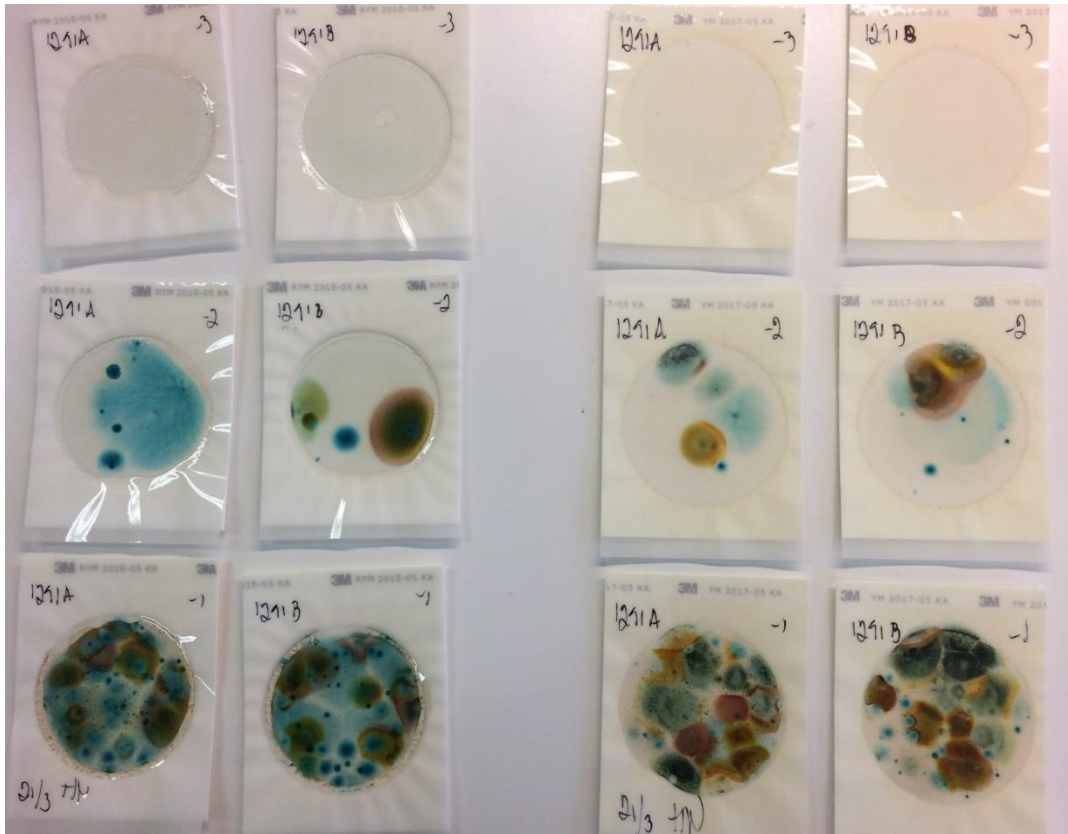
Resultater ved analyse av naturlige prøver med ny (RYM) og etablert (YM) metode;

### Gjær og mugg

Det er godt samsvar mellom resultatene fra de to metodene (Figur 2). Koloniene på RYM var tydelige og lett tellbare etter 3 døgn ved 27 °C (Figur 3).



Figur 2 Analyse av naturlige prøver (proteinkonsentrater, fiskefôr) med RYM og YM.



Figur 3 RYM filmer (venstre) og YM filmer (høyre) fra analyse av fiskefôr (Nofima 2017-1291-01). A og B representerer ekte paralleller. Prøvefortynning; nederst x10, i midten x100 og øverst x1000. RYM filmene ble avlest etter 3 dager ved 27 °C (deretter oppbevart i kjøll), mens YM filmene ble avlest etter 5 dager ved 22,5 °C.

## 5.2 Presisjon

### Resultater ved parallellanalyser av naturlige matrikser tilsatt referansemateriale

10 gram av ulike prøvematrikser (krillmel, fiskemel, fiskefôr, solsikkefrø, hvetekli) ble blandet med 90 ml fortynningsvann. Blandingen ble varmet hurtig opp til ca 90 °C i mikrobølgeovn for å inaktivere evt mugg og gjær i prøven. Etter avkjøling ble prøvene tilsatt 1 ml av referanseprøve SLV 2013:8. SLV oppgir kontrollintervaller for total mugg og gjær hvor enkeltanalyser bør havne for å kunne ansees som riktige med 95 % sikkerhet. Prøvene ble analysert i juni -17 (HN, AKG, JMS) og august -17 (HP, KML).

**Tabell 1** Parallellanalyser av gjær i ulike prøvematrikser tilsatt referanseprøve SLV 2013:8. SLVs initielle kontrollintervall for gjær var 1,8 - 2,6 (LOG CFU/g). HN: Halvor Nygaard, AKG: Anne Karin Godvik, JMS: Jan Moritz Sørensen, HP: Hege Pedersen, KML: Kari Magnussen Lie.

Matriks	Krillmel	Fiskemel	Fiskefôr	Solsikke	Hvetekli
Analytiker	HN	AKG	JMS	HP	KML
Replikant	LOG CFU/g	LOG CFU/g	LOG CFU/g	LOG CFU/g	LOG CFU/g
1	2,15	2,20	2,20	2,15	2,26
2	2,18	2,23	2,20	2,15	2,26
3	2,11	2,20	2,23	2,18	2,30
4	2,11	2,23	2,20	2,20	2,30
5	2,18	2,23	2,26	2,20	2,32
6	2,18	2,28	2,28	2,18	2,32
7	2,18	2,20	2,23	2,18	2,26
8	2,18	2,20	2,20	2,11	2,34
9	2,23	2,23	2,26	2,23	2,32
10	2,23	2,28	2,23	2,15	2,36
<b>Middelverdi (X)</b>	<b>2,17</b>	<b>2,23</b>	<b>2,23</b>	<b>2,17</b>	<b>2,30</b>
<b>Standardavvik (s<sub>r</sub>)</b>	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>
Kombinert standardavvik for repeterbarhet (S <sub>r</sub> ): 0,03397					
Standardavvik for reproduserbarhet (S <sub>R</sub> ): 0,06238					
Utvidet måleusikkerhet, k=2 (U): 0,12					

**Tabell 2** Parallellanalyser av mugg i ulike prøvematrikser tilsatt referanseprøve SLV 2013:8. SLVs initielle kontrollintervall for mugg var 1,3 - 2,1 (LOG CFU/g). Muggkolonier ble talt etter 5 dager inkubering. HN: Halvor Nygaard, AKG: Anne Karin Godvik, JMS: Jan Moritz Sørensen, HP: Hege Pedersen, KML: Kari Magnussen Lie.

Matriks	Krillmel	Fiskemel	Fiskefôr	Solsikke	Hvetekli
Analytiker	HN	AKG	JMS	HP	KML
Replikant	LOG CFU/g	LOG CFU/g	LOG CFU/g	LOG CFU/g	LOG CFU/g
1	1,36	1,30	1,30	1,40	1,11
2	1,52	1,28	1,26	1,08	1,23
3	1,51	1,30	1,36	1,28	1,26
4	1,38	1,18	1,23	1,40	1,30
5	1,45	1,28	1,41	1,26	1,45
6	1,36	1,34	1,40	1,00	1,26
7	1,40	1,38	1,34	1,40	1,23
8	1,45	1,15	1,41	1,20	1,18
9	1,40	1,23	1,38	1,18	1,34
10	1,51	1,15	1,15	1,26	1,23
<b>Middelverdi (X)</b>	<b>1,43</b>	<b>1,26</b>	<b>1,32</b>	<b>1,24</b>	<b>1,26</b>
<b>Standardavvik (s<sub>r</sub>)</b>	<b>0,06</b>	<b>0,08</b>	<b>0,09</b>	<b>0,14</b>	<b>0,09</b>
Kombinert standardavvik for repeterbarhet (S <sub>r</sub> ): 0,09489					
Standardavvik for reproduserbarhet (S <sub>R</sub> ): 0,11560					
Utvidet måleusikkerhet, k=2 (U): 0,23					

Måleusikkerhet ble estimert ut fra standardavviket for intern reproduserbarhet ( $S_R$ ). Estimatenes er basert på presisjon (repeterbarhet) innen analyseseriene og på presisjon mellom seriene (mellomserie-variansen) (jfr. NMKL prosedyre nr 8). Dersom et måleresultat skal oppgis som et 95 % konfidensintervall skal intern reproduserbarhet ( $S_R$ ) multipliseres med dekningsfaktor 2 ( $k=2$ ). Utvidet måleusikkerhet ( $U$ ) =  $S_R \times 2$ .

Basert på analyseresultatene i tabell 1 og 2 ble metodens utvidede måleusikkerhet ( $U$ ) beregnet til 0,12 ( $\log_{10}$  CFU/g) tilsvarende +33 %, -25 % for gjær og 0,23 ( $\log_{10}$  CFU/gram) tilsvarende +70 %, -41 % for mugg. Tidligere estimater av måleusikkerhet for YM ga noe høyere verdier; 0,13 ( $\log_{10}$  CFU/g) tilsvarende +34 %, -25 % for gjær og 0,37 ( $\log_{10}$  CFU/gram) tilsvarende +136 %, -58 % for mugg.

Både AOACs og AFNORs interlaboratorie-studier konkluderte med at repeterbarhet og reproduserbarhet for RYM er tilsvarende som for referansemetodene.

## 6 Konklusjon

Vi vurderer riktighet og presisjon av RYM som tilfredsstillende, basert på eksterne kollaborative metodeavprøvinger og intern verifisering av metodens riktighet og presisjon.

## 7 Referanser

Certificate 3M 01/13-07/14. NF Validation, 3M Rapid Yeast and Mold Petrifilm Plate [https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/09/3M-01-13-07-14\\_en.pdf](https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/09/3M-01-13-07-14_en.pdf)

Comparison of the Petrifilm Dry Rehydratable Film and Conventional Culture Methods for Enumeration of Yeasts and Molds in Foods: Collaborative study (1997). *Journal of AOAC International*, 80(4): 806-824.

EN ISO 16140 validation of 3M Rapid Yeast and Mold Petrifilm plate for yeast and mold enumeration in food, environmental samples, pet food and animal feed ([http://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/10/Synt-3M-01-13-07-14\\_en.pdf](http://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2014/10/Synt-3M-01-13-07-14_en.pdf)).

EN ISO 16140. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods.

Evaluation of the 3M Petrifilm Rapid Yeast and Mold Count Plate for the Enumeration of Yeast and Mold in Food: Collaborative Study, First Action #2014.05 (2015). *Journal of AOAC International*, 98(3): 767-783.

ISO 21527-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeast and mould – Part 1: Colony Count technique in products with water activity greater than 0,95.

ISO 21527-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeast and mould – Part 2: Colony Count technique in products with water activity less than or equal to 0,95.

NMKL Prosedyre nr 4. Validering av kjemiske analysemetoder.

US FDA BAM US Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, Ch. 18. Yeasts, Molds and Mycotoxins.

