



ACCREDIA
L'ENTE ITALIANO DI ACCREDITAMENTO

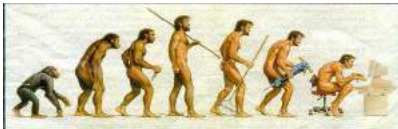
Verifica dei metodi microbiologici: aggiornamenti e novità

Federico Pecoraro
Vice Direttore Dipartimento Laboratori di Prova ACCREDIA

Emiliano Santoro
Funzionario Tecnico ACCREDIA

29 ottobre 2021
4/5 novembre 2021

Norme serie ISO 16140



- 2003: pubblicata la ISO 16140. Specifica per la validazione dei metodi alternativi
- Uscita dopo 10 anni di lavori! Nata da un progetto EU (EURECA), denominato Microval
- 2005: necessità di revisionarla e di emettere altre norme di validazione, aggiustando, nel contempo la terminologia
- 2006: avviato un GdL (*ISO TC 34/SC 9/WG 3*), con il seguente mandato:
 - revisionare la ed. 2003 della ISO 16140
 - sviluppare una norma sulla validazione dei metodi (normati) di riferimento
 - sviluppare una norma sulla validazione in un singolo laboratorio
 - sviluppare una norma sulla validazione dei metodi di conferma e di tipizzazione
 - sviluppare una norma sulla verifica

ACCREDIA

2

REGOLAMENTO (CE) N. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE
del 15 novembre 2005
sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

Art. 5 (Agg. 07/02/2019)

Definisce i **metodi di riferimento** da utilizzare (Allegato I), con possibilità di:

- utilizzare **metodi alternativi**, purché validati per confronto con il metodo di rif.
- utilizzare **metodi alternativi proprietari**, purché validati per confronto con il metodo di rif. e certificati da un organismo di certificazione indipendente.

Norme serie ISO 16140

ISO 16140-1: Vocabolario (2016)

- Fornisce le definizioni dei termini utilizzati nell'intera serie ISO 16140
- 20 pagine
- 3 paragrafi:
 - 1. Scopo
 - 2. Termini e definizioni (83)
 - 3. Bibliografia

*Iter molto lungo!
... logica delle classi e delle matrici rappresentative*

Norme serie ISO 16140

ISO 16140-2 (2016): Protocollo per la validazione di **metodi (proprietary) alternativi** rispetto ad un metodo di riferimento

ISO 16140-6 (2016): Protocollo per la validazione di **metodi (proprietary) alternativi per la conferma microbiologica e procedure di tipizzazione**

Forniscono il protocollo per la validazione dei metodi proprietari.

- rispetto al corrispondente metodo di riferimento
- 2 fasi: comparazione con il metodo di riferimento + studio interlaboratorio
- la parte 6 è specifica per la validazione della procedura di CONFERMA

Utilizzate dagli organismi di certificazione per la validazione di un metodo alternativo proprietario (includendo l'eventuale conferma e tipizzazione).

Di fatto, trattasi della revisione della Fed. 2003

ACCREDIA

5

Norme serie ISO 16140

ISO 16140-4 (2020): Protocollo per la validazione di un metodo all'interno di un singolo laboratorio

Fornisce il metodo di validazione all'interno di un singolo laboratorio

- i risultati sono validi solo nel laboratorio che ha eseguito la validazione
- possibili applicazioni:
 - validazione di un metodo interno
 - estensione del campo di applicazione di un metodo (es. estensione della categoria)
 - modifiche dei metodi esistenti (es. dimensione della porzione di prova)

Metodi interni

ACCREDIA

6

Norme serie ISO 16140

ISO 16140-5 (2020): Protocollo per la validazione inter-laboratorio fattoriale per metodi non proprietari

Prevede, utilizzando la progettazione fattoriale degli esperimenti, un numero di laboratori inferiore a quelli previsti dalla 16140-2

Richiede studi inter-laboratorio

Può essere utilizzato solo per metodi NON proprietari

*E' una semplificazione della parte 2
... non può essere utilizzata dagli enti di certificazione
dei metodi alternativi proprietari*

ACCREDIA

7

Norme serie ISO 16140

ISO 16140-3 (2021): Protocollo per la verifica dei metodi di riferimento e dei metodi alternativi validati

Risponde al requisito ISO/IEC 17025 per l'implementazione di un metodo (non definito dal laboratorio) all'interno di un laboratorio

Prevede 2 fasi:

1. verifica dell'implementazione
2. verifica delle matrici

I criteri di scelta del campione su cui eseguire le verifiche sono definiti nella norma, secondo la mappa delle categorie di alimenti rientranti nel **campo di applicazione del metodo** e nel **campo di applicazione del laboratorio**.

Le categorie sono definite nella norma (come per la validazione).

ACCREDIA

8

Alimenti destinati al consumo umano: 15 categorie

Raw milk and dairy products	Heat-processed milk and dairy products	Raw meat and ready-to-cook meat products (except poultry)	Ready-to-eat, ready-to-reheat meat products	Raw poultry and ready-to-cook poultry products
Eggs and egg products (derivatives)	Raw and ready-to-cook fish and seafoods (unprocessed)	Ready-to-eat, ready-to-reheat fishery products	Fresh produce and fruits	Processed fruits and vegetables
Ready-to-eat, ready-to-reheat meat poultry products	Dried cereals, fruits, nuts, seeds and vegetables	Infant formula and infant cereals	Chocolate, bakery products and confectionary	Multi-component foods or meal components

+ 3 altre categorie

Alimenti destinati agli animali
Campioni prelevati sulle superfici degli ambienti dove avviene la lavorazione/produzione degli alimenti
Campioni prelevati negli ambienti dove avviene la produzione primaria

... eliminazione della soggettività nella assimilabilità delle matrici! (sia per validazione che verifica)

ACCREDIA

9

L'ISO ha definito le parti 2 e 3 "documenti ad alto profilo" perché essenziali per l'industria globale degli alimenti.

1. Terminology

2. Validation of (alternative) methods

← Enti di certificazione

3. Methods verification

← > 95% dei Laboratori

4. In-house single laboratory method validation

← < 5% dei Laboratori

5. Factorial multi-laboratory method validation

6. Validation for confirmation methods

← Enti di certificazione

ACCREDIA

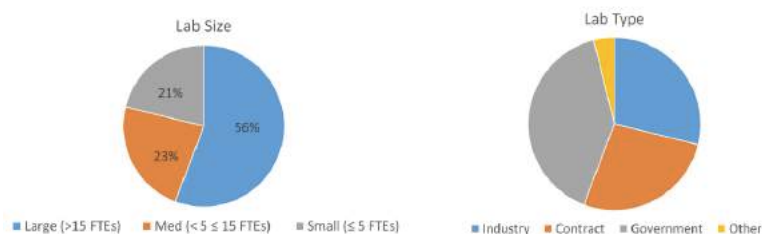
10

Indagine condotta da ISO sulla parte 3: comprensione del testo e attuazione pratica.

User Laboratory Response



52 of 60 labs responded = 80% response rate!

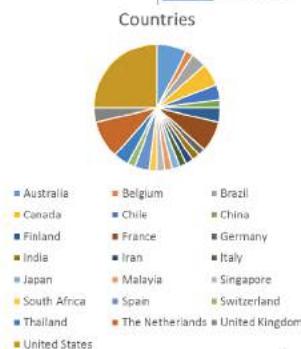
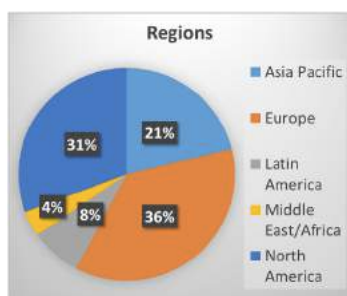


ACCREDIA

11

Indagine condotta da ISO sulla parte 3: comprensione del testo e attuazione pratica.

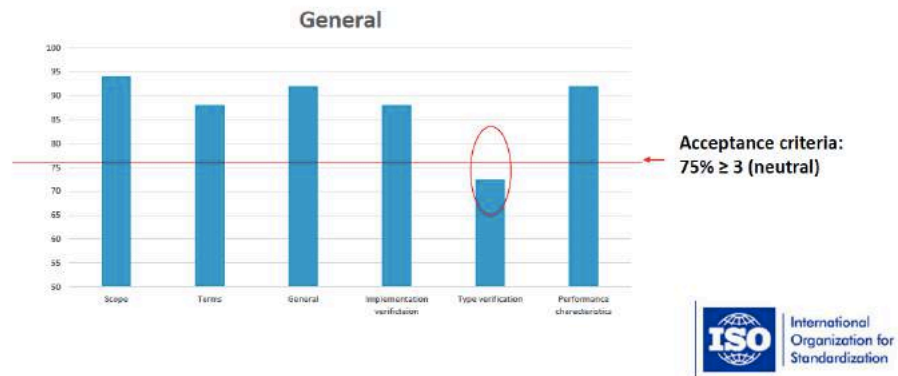
User Laboratory Participation



ACCREDIA

12

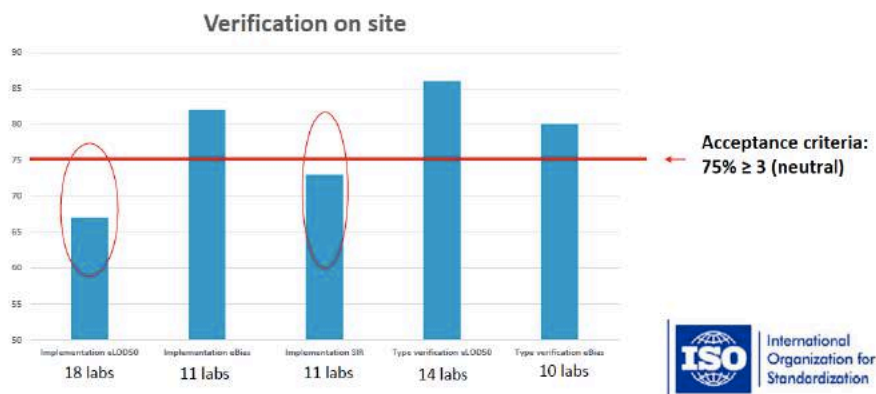
User Laboratory Evaluation: *Text Comprehension*



ACCREDIA

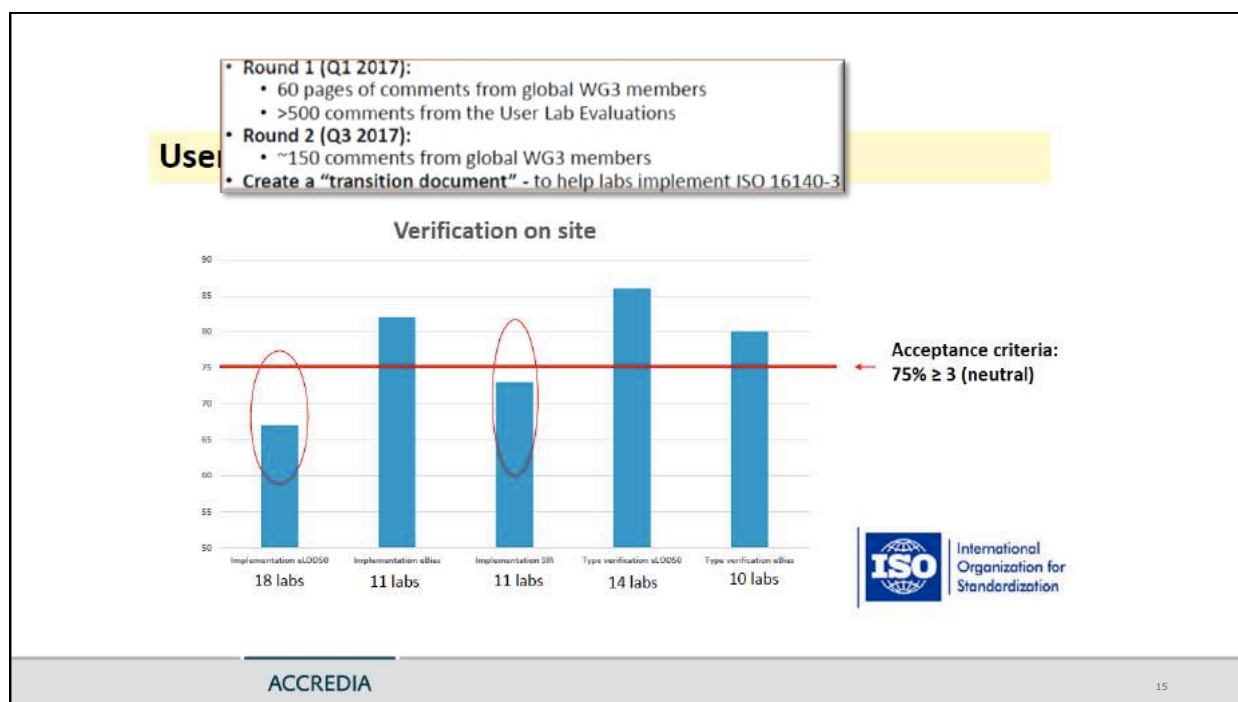
13

User Laboratory Evaluation: *Practice*



ACCREDIA

14



ISO 16140-3:2021

E' importante distinguere validazione e verifica

(da ISO 16140-3:2021)→

→3.20 validation

Determinazione delle caratteristiche prestazionali di un metodo e fornitura di prove oggettive che i requisiti di prestazione per un uso specificato sono soddisfatti

→3.21 verification

Dimostrazione che, nelle mani dell'utilizzatore, un metodo validato ha prestazioni secondo le specifiche del metodo determinate nello studio di validazione ed è adatto allo scopo previsto

ISO 16140-3:2021

→La norma specifica protocolli per la verifica dei metodi di riferimento ed alternativi (rilevazione e/o quantificazione), conferma e tipizzazione di microrganismi

→Matrici: prodotti destinati al consumo umano, alimentazione animale, campioni ambientali in ambito alimentare e produzione di mangimi e manipolazione, campioni provenienti dalla fase di produzione primaria

→applicabile a batteri e funghi

ISO 16140-3:2021

Distinguiamo inoltre metodo di riferimento e metodo alternativo (da ISO 16140-1:2016)

→2.59 reference method

internationally recognized and widely accepted method

→2.4 alternative method (method submitted for validation)

method of analysis that detects or quantifies, for a given category of products, the same *analyte* as is detected or quantified using the corresponding *reference method* (→2.59)

Note 1 to entry: The method can be proprietary. The term 'alternative' is used to refer to the entire 'test procedure and reaction system'. This term includes all ingredients, whether material or otherwise, required for implementing the method.

ISO 16140-3:2021

Prima di poter usare un metodo in laboratorio cosa fare?

1→il metodo deve essere validato:

- ISO 17468→metodi di riferimento standardizzati,
- ISO 16140-2, ISO 16140-5, ISO 16140-6→studio in singolo laboratorio seguito da uno studio interlaboratorio;
- ISO 16140-4→validazione in un singolo laboratorio senza studio interlaboratorio

2→il metodo deve essere verificato dal singolo laboratorio per accertarsi di poterlo applicare in maniera soddisfacente:

ISO 16140-3→la verifica è applicabile solo ai metodi validati con l'utilizzo di studi interlaboratorio

ISO 16140-3:2021

La verifica è costituita da 2 steps

1→Implementation verification (verifica dell'implementazione)

- serve a dimostrare che il laboratorio può utilizzare il metodo correttamente;
- *si utilizza 1 solo food item (articolo alimentare)*

2→(food) item verification (verifica degli articoli alimentari)

- serve a dimostrare che il laboratorio può utilizzare il metodo su matrici (food items) che rientrano nell'applicazione (routine) del laboratorio stesso
- *si applica sulle categorie testate nel laboratorio*

ISO 16140-3:2021

3. Termini e definizioni

3.2

bias

measurement bias

estimate of a systematic measurement error, or the systematic difference between the quantitative assigned value and the average of measurement replicate results

[SOURCE: ISO 16140-1:2016, 2.9]

3.3

(food) category

group of *(food) types* (3.18) of the same origin

EXAMPLE Food category: heat-processed milk and dairy products. Food type: pasteurized dairy products. Food item: crème brûlée.

Note 1 to entry: The (food) categories are listed in [Annex A](#).

[SOURCE: ISO 16140-1:2016, 2.11, modified — In the term, "(food)" has been added before "category". In the definition, "(food)" has replaced "sample". The example has been modified to align with the terms used in [Annex A](#). Note 1 to entry has been added.]

ISO 16140-3:2021

3. Termini e definizioni

3.4

estimated bias

eBias

determination of the *bias* (3.2) based on the experimental design described in this document (i.e. e. ISO 16140-3)

Note 1 to entry: An accurate determination of the bias is not possible as the number of samples tested is small. ll. Therefore, the term "estimated bias" ("eBias") is used in this document.

3.5

estimated LOD₅₀

eLOD₅₀

determination of the LOD₅₀ (level of detection at 50 % probability of detection) based on the experimental design described in this document

ISO 16140-3:2021

3. Termini e definizioni

3.8

(food) item

single specified food, feed, environmental or primary production *matrix* (3.10)

EXAMPLE Food category: heat-processed milk and dairy products. Food type: pasteurized dairy products.
Food item: crème brûlée.

[SOURCE: ISO 16140-1:2016, 2.34, modified — In the term, “(food)” has been added before “item”. The example has been modified to align with the terms used in [Annex A](#).]

3.13

scope of laboratory application

categories, matrices, analytes and concentrations for an analytical method that a *user laboratory* (3.19) claims to be capable of satisfactorily testing in its laboratory

Note 1 to entry: A method may have been validated to a broader range (scope) of analytes, matrices and concentrations than the scope that will be claimed by a user laboratory. The scope of laboratory application is \leq the *scope of validation* (3.14).

ISO 16140-3:2021

3. Termini e definizioni

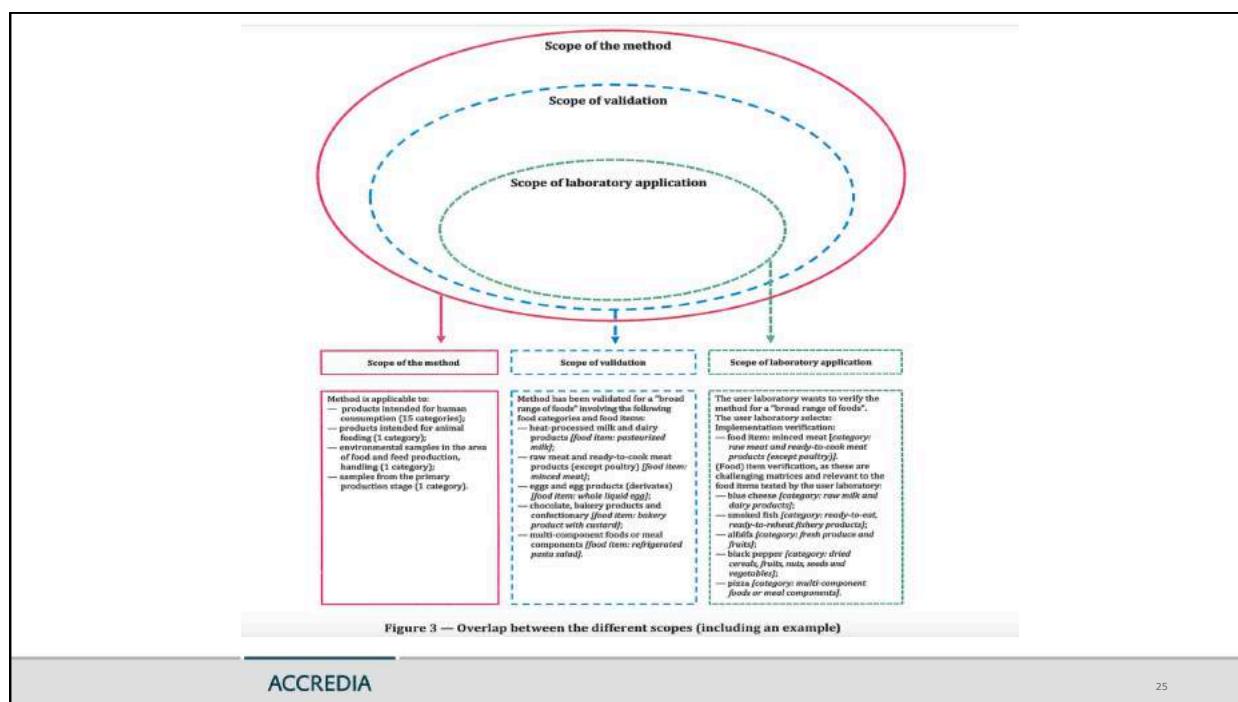
3.18

(food) type

for a given *(food) category* (3.3), a group of *(food) items* (3.8) processed in a similar way, with similar intrinsic characteristics and a similar microbial ecology

EXAMPLE Food category: heat-processed milk and dairy products. Food type: pasteurized dairy product.

[SOURCE: ISO 16140-1:2016, 2.78, modified — In the term and the definition, “(food)” has been added before “type”, “category” and “items”.]



ISO 16140-3:2021

4. Principi generali

→Prima di eseguire la verifica: riferirsi al protocollo di validazione del metodo

→E per i metodi di riferimento non validati? Far riferimento all'Annex F della norma

ISO 16140-3:2021
4. Principi generali**4.2 Implementation verification (verifica dell'implementazione)**

Metodi qualitativi

→scegliere 1 food item (articolo alimentare) sottoposto a prova durante lo studio di validazione compreso nel campo di applicazione del laboratorio (se non sono disponibili food items rientranti nel campo di applicazione del laboratorio l'attività dovrà comunque essere svolta su un food item che rientri nello studio di validazione in quanto il limite di rilevabilità è influenzato dal food item)

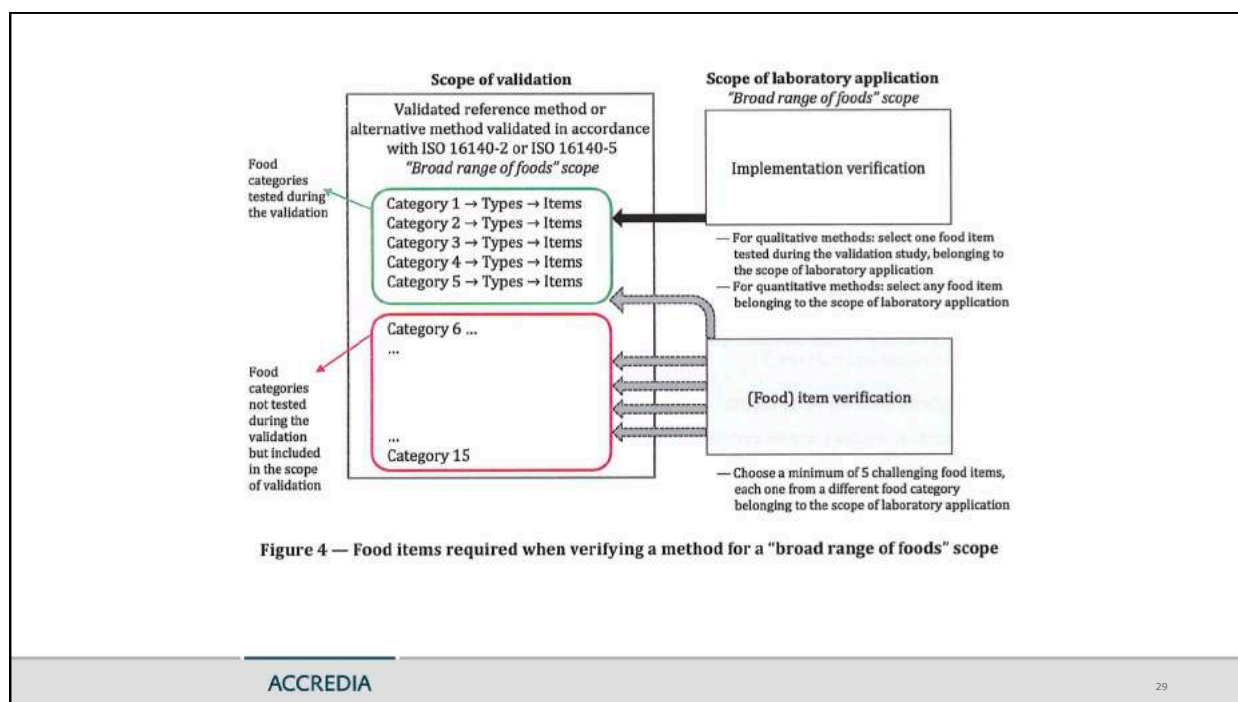
Metodi quantitativi

→scegliere 1 (food) item qualsiasi dal campo di applicazione della validazione

ISO 16140-3:2021
4. Principi generali**4.3 (Food) item verification (verifica degli articoli alimentari)**

→selezionare 1 challenging food item da ciascuna categoria compresa nel campo di applicazione della validazione che sia anche una categoria compresa nel campo di applicazione del laboratorio

Annex B
fornisce guida
su come
scegliere
challenging
(food) items



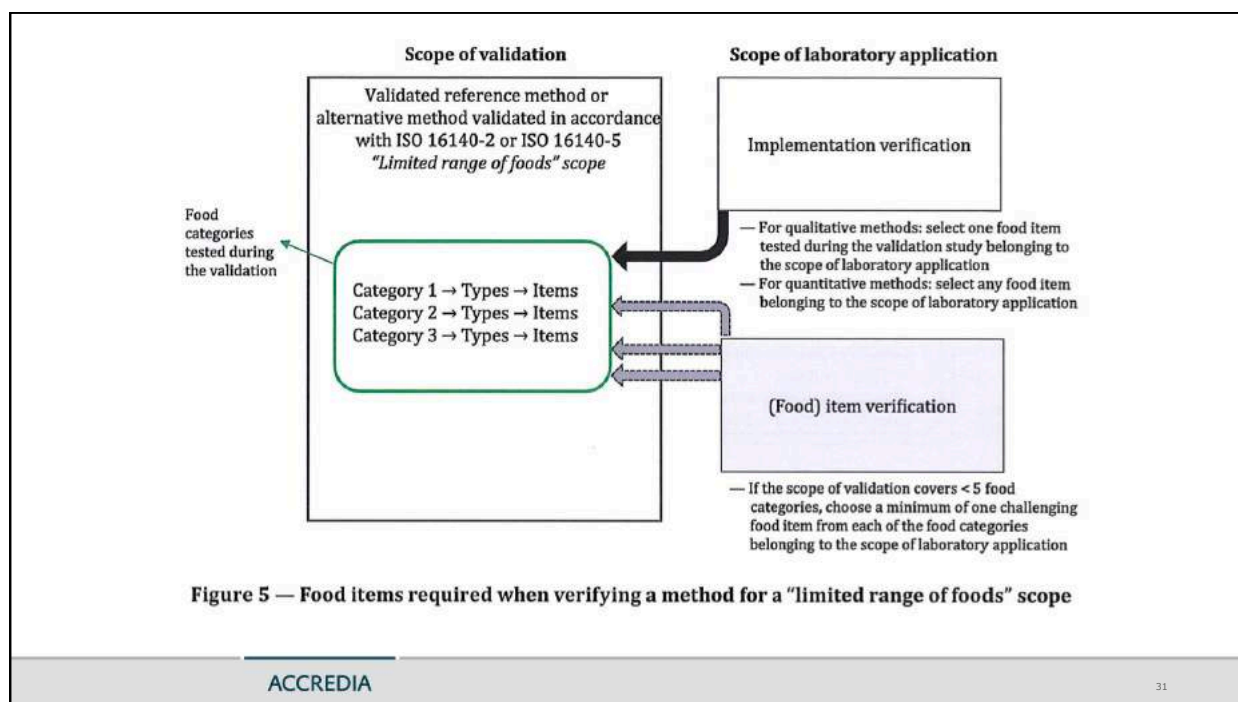
ISO 16140-3:2021

4. Principi generali

4.4 Requisiti per implementation verification e (Food) item verification

→Figura 4: per dichiarare come campo di applicazione »*broad range of foods*« (ampia gamma di alimenti) il laboratorio deve aver incluso almeno 5 categorie nello studio di food item verification (verifica degli articoli alimentari)

→Se il campo di applicazione del laboratorio è ridotto andranno invece incluse solo le categorie di interesse: il laboratorio applicherà il metodo solo su queste categorie!



ISO 16140-3:2021

4. Principi generali

4.4 Requisiti per implementation verification e (Food) item verification

→Figura 5: nel caso in cui il campo di applicazione della validazione sia »*limited range of foods*« (gamma limitata di alimenti) il laboratorio non potrà includere categorie che non rientrino nel campo limitato di applicazione del metodo

→Se il campo di applicazione del laboratorio è ridotto rispetto al campo di applicazione della validazione del metodo andranno incluse solo le categorie di interesse: il laboratorio applicherà il metodo solo su queste categorie!

→In caso di validazione di 1 sola categoria gli studi di implementation verification e (Food) item verification andranno condotti su almeno 2 items diversi (1 per ciascuno studio)

Table 1 — Summary of the minimum number of (food) items required for verification

Scope of validation	Number of samples		
	Implementation verification	(Food) item verification	Total
"Broad range of foods" scope ≥ 5 food categories	1	≥ 5	≥ 6
"Limited range of foods" scope N_{food} categories	1	$N_{\text{food}} \leq 4$	$(N_{\text{food}} + 1) \leq 5$
"Broad range of foods" + other categories (N_{other}) scope	1	≥ 5 food items + 1 item from each of the N_{other} other categories	$\geq 6 + N_{\text{other}}$
"Limited range of foods" N_{food} categories + other categories (N_{other}) scope	1	$N_{\text{food}} \leq 4$ + 1 item from each of the N_{other} other categories	$(N_{\text{food}} + N_{\text{other}} + 1) \leq 8$
Other categories (N_{other}) scope only	1	$N_{\text{other}} \leq 3$	$(N_{\text{other}} + 1) \leq 4$

ISO 16140-3:2021

4. Principi generali

4.5 Performance

4.5 Performance characteristics

Table 2 lists the required performance characteristics for method verification.

Table 2 — Required performance characteristics to be determined for verification

Method	Performance characteristic	Implementation verification	(Food) item verification
Qualitative	Estimated LOD ₅₀ (eLOD ₅₀)	✓	✓
Quantitative	Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR})	✓	Not applicable
	Estimated bias (eBias)	Not applicable	✓

NOTE 1 The relationship between intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR}) and ISO 19036 is explained in 6.1.

NOTE 2 For the verification of qualitative method, three protocols are proposed to the user laboratory. The protocol 3 does not require a determination of an eLOD₅₀ but to target a concentration of 3 cfu to 5 cfu/test portion.

ISO 16140-3:2021**4. Principi generali****4.5 Performance**

→**eLOD50** – disponibili 3 protocolli per determinarlo

→**SIR** – protocollo allineato con ISO 19036:2019

→**eBias** – Analizzare in parallelo il metodo da verificare con il (food) item versus inoculo (senza food item) a 3 livelli di concentrazione

ISO 16140-3:2021**5 Metodi qualitativi**

→Utilizzare i dati di LOD_{50} dichiarati nei dati performance del metodo (studio di validazione) per le corrispondenti categorie di alimenti

→Per (food) item verification, in caso di indisponibilità di valori di LOD_{50} corrispondenti al (food) item testato, considerare un LOD_{50} pari a 1 ufc/test portion

→Valutare i risultati mediante le tabelle al p.to 5.5

ISO 16140-3:2021
5 Metodi qualitativi

→ Esempio: Salmonella spp ISO 6579

→ LOD₅₀ per formaggio fresco: 5,7 ufc/test portion

→ **Protocollo 1:**

High level: 5,7x9=54 ufc/test portion

Intermediate level: 5,7x3=18 ufc/test portion

Low level: 5,7x1=6 ufc/test portion

ACCRECIA

37

ISO 16140-3:2021
5 Metodi qualitativi

Table 6 — Determination of eLOD₅₀ based on the number of positive results per level of contamination using protocol 1

High inoculation level targeted 9 × LOD ₅₀ / test portion	Intermediate inoculation level targeted 3 × LOD ₅₀ / test portion	Low inoculation level targeted 1 × LOD ₅₀ / test portion	Blank level	eLOD ₅₀ cfu/test portion
1/1	4/4	4/4	0/1	< 1,0 × LIL ^a
1/1	4/4	3/4	0/1	= 0,5 × LIL
1/1	4/4	2/4	0/1	= 0,7 × LIL

Esempio: 0,5xLIL (Low Inoculation Level) → eLOD₅₀ = 0,5x6=3 ufc

ACCRECIA

38

ISO 16140-3:2021
5 Metodi qualitativi**Table 16 — Acceptability limits for the verification of validated methods**

Method	Performance characteristics	Acceptability limits
Qualitative	eLOD ₅₀	For protocols 1 and 2: eLOD ₅₀ ≤ 4 × LOD ₅₀ For protocol 3: ≥ 6 out of 7 positive results
Quantitative	S _{IR}	S _{IR} ≤ 2 × lowest S _R mean value ^a determined in the validation study
	eBias	log ₁₀ cfu/ml (inoculum) – mean log ₁₀ cfu/test portion (artificially contaminated [food] item) ≤ 0,5 log ₁₀ for each of the inoculation levels
Confirmation or typing	inclusivity and exclusivity	100 % agreement between methods

^a S_{IR} ≤ 2 × S_R for validation studies with only one S_R value.

ISO 16140-3:2021
5 Metodi qualitativi

→ Per (food) item verification eLOD₅₀ ≤ 4 × LOD₅₀

→ Se non sono disponibili valori di LOD₅₀ per il (food) item, eLOD₅₀ < 4 ufc/test portion

ISO 16140-3:2021**5 Metodi qualitativi**

- Esempio: Salmonella spp ISO 6579
- LOD₅₀ per formaggio fresco: 5,7 ufc/test portion
- **eLOD₅₀ ≤ 4 x LOD₅₀ :**
3 ufc < (4 x 5,7=22,8)

ISO 16140-3:2021**6 Metodi quantitativi****Implementation verification:**

- **Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR}):**
 - Quasi tutti (food) item nello scopo di validazione del metodo
 - S_{IR} determinato secondo ISO 19036:2019
 - Applicare il metodo per intero, inclusi step di conferma se previsti

Annex D fornisce guida ed esempi per la preparazione di campioni e test portions

ISO 16140-3:2021
6 Metodi quantitativi**Implementation verification:****→ Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR}):**

- Un minimo di 10 campioni appartenenti allo stesso (food) item
- Differenti lotti, o differenti produttori
- Introdurre altre variabili (diversi operatori, diversi terreni, diverse apparecchiature...)
- Livelli di contaminazione rappresentativi della realtà del laboratorio

ISO 16140-3:2021
6 Metodi quantitativi**Table 16 — Acceptability limits for the verification of validated methods**

Method	Performance characteristics	Acceptability limits
Qualitative	eLOD ₅₀	For protocols 1 and 2: eLOD ₅₀ ≤ 4 × LOD ₅₀ For protocol 3: ≥ 6 out of 7 positive results
Quantitative	S_{IR}	$S_{IR} \leq 2 \times$ lowest S_R mean value ^a determined in the validation study
	eBias	$ \log_{10} \text{ cfu/ml (inoculum)} - \text{mean } \log_{10} \text{ cfu/test portion (artificially contaminated [food] item)} $ ≤ 0,5 log ₁₀ for each of the inoculation levels
Confirmation or typing	inclusivity and exclusivity	100 % agreement between methods

^a $S_{IR} \leq 2 \times S_R$ for validation studies with only one S_R value.

ISO 16140-3:2021

6 Metodi quantitativi

(food) item verification:

→ Estimated Bias (eBias):

- Selezionare (food) items (almeno 1 da ciascuna categoria)
- Contaminare artificialmente a 3 livelli campioni o lotti
diversi per ciascun livello, testando ciascun livello in duplicato
- Eseguire enumerazione su (food) item contaminato e sull'inoculo (senza item)
- Testare una porzione non inoculata per determinare la conta in background

Annex B
fornisce guida
su come
scegliere
challenging
(food) items

ISO 16140-3:2021

6 Metodi quantitativi

Table 16 — Acceptability limits for the verification of validated methods

Method	Performance characteristics	Acceptability limits
Qualitative	eLOD ₅₀	For protocols 1 and 2: eLOD ₅₀ ≤ 4 × LOD ₅₀ For protocol 3: ≥ 6 out of 7 positive results
Quantitative	S _{IR}	S _{IR} ≤ 2 × lowest S _R mean value ^a determined in the validation study
	eBias	log ₁₀ cfu/ml (inoculum) – mean log ₁₀ cfu/test portion (artificially contaminated [food] item) ≤ 0,5 log ₁₀ for each of the inoculation levels
Confirmation or typing	inclusivity and exclusivity	100 % agreement between methods

^a S_{IR} ≤ 2 × S_R for validation studies with only one S_R value.

Table 13 — Test results obtained using the method to be verified

	Mean result Artificially contaminated (food) item (log ₁₀ cfu/g or ml) ^a	For comparison		eBias: absolute difference in results between artificially contaminated (food) item per test portion and the inoculum suspension
		Result Artificially contaminated (food) item (log ₁₀ cfu/ test portion) ^a	Result Inoculum suspension [without (food) item] (log ₁₀ cfu/ml)	
Laboratory sample 1 (from batch 1), test portion 1	2,06 (average of 1,87 and 2,25)	3,06	3,17	0,11
Laboratory sample 1 (from batch 1), test portion 2				
Laboratory sample 2 (from batch 2), test portion 1	3,11 (average of 3,16 and 3,06)	4,11	4,05	0,06
Laboratory sample 2 (from batch 2), test portion 2				
Laboratory sample 3 (from batch 3), test portion 1	3,99 (average of 3,93 and 4,04)	4,99	5,29	0,30
Laboratory sample 3 (from batch 3), test portion 2				

^a This example is based on the use of a 10-gram test portion inoculated with 1 ml of inoculum.

The results indicate that at each level of contamination the absolute difference between the two results is less than 0,5 log₁₀, so the method to be verified works correctly in the user laboratory.

≤0,5

OK!

ISO 16140-3:2021

7 Verifica di metodi alternativi per la conferma e tipizzazione

→ solo implementation verification (campione: colonia isolata)

- verificare il protocollo di validazione
- scegliere un terreno selettivo utilizzato nella validazione
- utilizzare questo terreno per implementation verification
- se non stati utilizzati terreni selettivi, scegliere un terreno non selettivo tra quelli utilizzati nella validazione

Annex E fornisce guida ed esempi

ISO 16140-3:2021
7 Verifica di metodi alternativi per la conferma e tipizzazione
Table 14 — Number of strains for implementation verification of validated alternative confirmation or typing methods

Level of the confirmation	Inclusivity study	Exclusivity study
Family	5	5
Genus		
Species		
Microbial (sub)type (e.g. serotyping of <i>Salmonella</i>)		

 ACCREDIA

49

ISO 16140-3:2021
7 Verifica di metodi alternativi per la conferma e tipizzazione
Table 16 — Acceptability limits for the verification of validated methods

Method	Performance characteristics	Acceptability limits
Qualitative	eLOD ₅₀	For protocols 1 and 2: eLOD ₅₀ ≤ 4 × LOD ₅₀ For protocol 3: ≥ 6 out of 7 positive results
Quantitative	S _{IR}	S _{IR} ≤ 2 × lowest S _R mean value ^a determined in the validation study
	eBias	log ₁₀ cfu/ml (inoculum) – mean log ₁₀ cfu/test portion (artificially contaminated [food] item) ≤ 0,5 log ₁₀ for each of the inoculation levels
Confirmation or typing	inclusivity and exclusivity	100 % agreement between methods

^a S_{IR} ≤ 2 × S_R for validation studies with only one S_R value.

 ACCREDIA

50

ISO 16140-3:2021**Annex F → verifica di metodi di riferimento non validati**

- metodo: categorie e prodotti per i quali è dichiarato applicabile
- laboratorio: categorie e prodotti per i quali il metodo è dichiarato in uso
- dimostrare la capacità di utilizzare il metodo di riferimento (non validato) su (food) items testati in laboratorio
- no implementation verification perché il metodo non è validato

Annex E fornisce guida ed esempi

ISO 16140-3:2021**Annex F → verifica di metodi di riferimento non validati**

- selezionare 1 non-challenging (food) item da una categoria che rientra nello scopo del metodo di riferimento
- selezionare 1 challenging (food) item da ciascuna categoria dello scopo del metodo di riferimento che rientra anche nell'applicazione del laboratorio

ISO 16140-3:2021
Annex F → verifica di metodi di riferimento non validati
Table F.2 — Required performance characteristics to be determined for verification of a non-validated reference method

Method	Performance characteristic	Implementation verification	(Food) item verification
Qualitative	Estimated LOD ₅₀ (eLOD ₅₀)	Not applicable	✓
Quantitative	Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR})	Not applicable	Not applicable
	Estimated bias (eBias)	Not applicable	✓

NOTE For the verification of a qualitative method, three protocols are proposed to the user laboratory. The protocol 3 does not require a determination of an eLOD₅₀ but to target a concentration of 3 cfu to 5 cfu/test portion.

Tempistiche per l'implementazione

Tempistiche per l'implementazione

Definita da ISO e CEN
Non dagli enti di accreditamento!

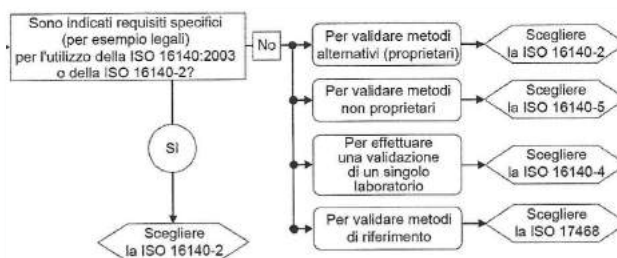
ACCREDIA

55

La verifica prevista dalla parte 3 della ISO 16140 trova applicazione solo per i metodi che sono già validati secondo le norme richiamate dalla norma stessa.

Ovvero,

- solo i metodi i cui campi di applicazione riflettono il numero di classi sottoposte a validazione
- solo i metodi dove le classi sono state costruite secondo le denominazioni e accorpamenti definiti nella norma stessa
- solo i metodi che riportano le caratteristiche prestazionali che servono per confrontare i risultati della verifica (vedi S_{IR} , LOD_{50}).



ACCREDIA

56

E' ben vero che esiste l'Annex F (che vale solo per i metodi di riferimento), ma l'ISO (TC 34/ SC 9) e il CEN (TC 463) hanno chiarito, in un documento, che tale Annex vale **solo fino al 31/12/2027**.

Ciò per dar tempo:

- agli enti che hanno emesso i metodi di riferimento di revisionarli e/o validarli
- agli enti di certificazione dei metodi alternativi proprietari di revisionare le certificazioni rilasciate e/o a rivalidare i metodi
- ai laboratori che hanno emesso metodi alternativi di revisionarli e/o validarli.

Ciò implica che dal 1 gennaio 2028 la verifica secondo ISO 16140-3 può essere eseguita solo dopo che il metodo è stato validato secondo le regole di cui sopra.

Per implementare la parte 3 nel periodo di validità dell'Annex F (prossimi 6 anni), l'ISO/CEN hanno prospettato i casi riportati nella tabella di seguito riportata.

ACCREDIA

57

§ doc. ISO 19/01/2021	Stato del metodo	Attività in carico al laboratorio	§
3	Metodo già accreditato	Non serve fare la verifica	-
4	Estensione dell'accREDITAMENTO a nuovo metodo	Metodo validato secondo le regole stabilite: verifica come da §:	5/6/7
		Metodo (di riferimento) non validato secondo le regole stabilite: verifica come da §:	F
4	Aggiunta di categorie di prodotti	Metodo validato secondo le regole stabilite: verifica come da §:	5/6/7
		Metodo (di riferimento) non validato secondo le regole stabilite: verifica come da §:	F
5	Revisione di un metodo	Metodo di riferimento validato secondo le regole stabilite e solo se la ri-validazione evidenzia un impatto significativo sulle caratteristiche prestazionali del metodo (questa informazione sarà indicata sul metodo stesso): verifica come da §:	5/6/7
		Metodo di riferimento non validato secondo le regole stabilite: verifica come da §:	F
		Metodo alternativo validato secondo le regole stabilite e se l'organismo di certificazione lo prevede (questa informazione sarà presente nel report di validazione): verifica come da §:	5/6/7

ACCREDIA


58

—

Grazie per l'attenzione

ACCREDIA 59

—



Intervento del dott. Stefano Colombo
Rappresentante UNI in ISO TC 34/SC 9/WG3

—

ACCREDIA 60



Attuazione della norma ISO 16140-3
Programma di validazione dei metodi di riferimento standardizzati

ISO/TC 34/SC 9 ha lanciato una consultazione per stabilire un piano di validazione dei metodi di riferimento che non sono validati o che lo sono solo per poche categorie di alimenti.

Entro il 30 novembre 2021 UNI dovrà inviare a ISO la lista dei laboratori che intendono organizzare o aderire agli studi di validazione.

I laboratori interessati possono esprimere la loro disponibilità inviando una mail a barbara.pignataro@uni.com e info@accredia.it