

Congresso Nazionale del Dipartimento Laboratori di prova

IN PRESENZA / ON LINE

20 settembre 2022
Ore 9.00 - 16.30

Palazzo della Gran Guardia
Auditorium - Piazza Bra - Verona

28 settembre 2022
Ore 9.00 - 16.30

Centro Congressi Frentani
Sala Convegni - via dei Frentani 4 - Roma

UNI EN ISO 16140-3:2021

Microbiologia della catena alimentare - Validazione del metodo
- Parte 3: Protocollo per la verifica dei metodi di riferimento e
metodi alternativi validati in un singolo laboratorio

La complessità della norma e le difficoltà di applicazione

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Perché ISO 16140-3?

- **Requisito di ISO 17025**
 - 7.7.1 : “The laboratory **shall** verify that it can properly perform methods before introducing them by ensuring that it can achieve the required performance. Records of the verification shall be retained.”
- **Pochi protocolli “ufficiali”**
 - es: NMKL Procedure 32
 - <https://www.nmkl.org/product/verification-of-microbiological-methods/>
- **Diversi e vari protocolli di validazione adottati dai laboratori**
- **Scarsa comparabilità, molta incoerenza, quindi necessità di una norma**
- **Attenzione : lo scostamento dalla norma, di per sé già molto complessa, per l'aggiunta di requisiti addizionali genera un effetto opposto rispetto allo scopo della stessa, genera cioè incongruenza dei risultati su base globale.**

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Linguaggio e terminologia

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Semantica in ISO 16140-3

In rosso: numero di ricorrenze del lemma verbale

ISO 16140-3:2021(E)

In this document:

- “shall” indicates a requirement; (87)
- “should” indicates a recommendation; (non è un requisito) (15)
- “may” indicates a permission; (offre un’opzione accettabile) (17)
- “can” indicates a possibility or a capability. (indica la possibilità o la capacità) (107)

Information marked “NOTE” is for guidance in understanding or clarifying the associated sentence.
(è una spiegazione, un chiarimento) (66)

Semantica : ramo della [linguistica](#) che si occupa dei fenomeni del [linguaggio](#) non dal punto di vista fonetico e morfologico, ma guardando al loro [significato](#). Il termine fu coniato da M. Bréal nel 1883 come sostituto di semasiologia. <https://www.treccani.it/enciclopedia/semantica/> (accesso 19/9/2022)

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

To implement

implement

verb [T]

UK  /'im.pli.ment/ US  /'im.plə.ment/

B2

to start using a plan or system:

• The changes to the national health system will be implemented next year.

implement | DIZIONARIO INGLESE AMERICANO

implement

verb [T]

US  /'im.plə.ment/

to put a plan or system into operation:

• Congress refused to pass the bill that would implement tax reforms.

implement | INGLESE PER GLI AFFARI

implement

verb [T]

UK  /'ɪm.plɪ.mənt/ US 

to put a plan into action:

• to implement a plan/policy/measure The corporation has implemented a new compensation plan for its sales force.

• to implement a change/program/recommendation

IT

to begin to use a new system:

• The purchased package or the new IT infrastructure is implemented by specialists in that technology.

(Definizione di **implement** dal *Cambridge Business English Dictionary* © Cambridge University Press)

<https://dictionary.cambridge.org/it/dizionario/inglese/implement> (accesso 19/9/2022)

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Introduzione 1

La norma specifica il protocollo per

- la verifica dei metodi di riferimento e metodi alternativi validati
- per l'implementazione nel laboratorio utilizzatore.
- La norma è applicabile alla verifica dei metodi utilizzati per l'analisi (rilevazione e / o quantificazione), conferma e tipizzazione dei microrganismi in: - prodotti destinati al consumo umano; - prodotti destinati all'alimentazione animale; - campioni ambientali in ambito alimentare e produzione di mangimi, manipolazione; - campioni provenienti dalla fase di produzione primaria. Questo documento è, in particolare, applicabile a batteri e funghi. Alcuni punti possono essere applicabili ad altri (micro) organismi o ai loro metaboliti, da determinare caso per caso.

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Introduzione 2

La norma specifica i protocolli possibili per

- la verifica dei metodi qualitativi e quantitativi di riferimento, validati e non, e dei metodi alternativi validati
- per la prima implementazione nel laboratorio utilizzatore.
- La norma è applicabile alla verifica dei metodi utilizzati per
 - l'analisi (rilevazione e / o quantificazione), conferma e tipizzazione dei microrganismi in:
 - prodotti destinati al consumo umano;
 - prodotti destinati all'alimentazione animale;
 - campioni ambientali in ambito alimentare e produzione di mangimi, manipolazione;
 - campioni provenienti dalla fase di produzione primaria.
- Questo documento è, in particolare, applicabile a batteri e funghi.
- Alcuni punti possono essere applicabili ad altri (micro) organismi o ai loro metaboliti, da determinare caso per caso.

I principi di base

“Verification Workflow”

1. Selezionare il metodo da implementare

2. Rivedere lo scopo della validazione

3. Definire lo scopo della verifica

4. Selezionare le matrici da verificare

5. Effettuare la verifica

6. Registrare e rivedere i risultati

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Le prestazioni del metodo soggette a verifica

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.

- **eLOD₅₀** : tre protocolli possibili
- **S_{IR}** : calcolo allineato a ISO 19036
- **eBias** : tre livelli di inoculo in campioni duplicati

**Non è richiesto
lo stress della coltura
dell'inoculo**

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Step 1 : verifica dell'implementazione (one food item)

Competenza ad eseguire correttamente il metodo su una matrice validata **non challenging** e nel **"campo d'uso"**.

Metodi qualitativi

- Verificare una matrice di una categoria/tipi validati su porzione analitica validata
- Determinare la eLOD50 (protocollo 1 o 2) o il tasso di positivi (protocollo 3)

Metodi quantitativi

- Verificare una matrice di una qualsiasi categoria/tipo validati
- Determinare la S_r (dev.std. della riproducibilità intra-laboratorio = UOM)

Step 2 : verifica della matrice (multiple food items)

Competenza ad eseguire correttamente il metodo su più matrici validate **challenging** e nel **"campo d'uso"**.

Metodi qualitativi

- Verificare 1 matrice *challenging* per ognuna delle categorie/tipi validati su porzione analitica validata
- Determinare la eLOD50 (protocollo 1 o 2) o il tasso di positivi (protocollo 3)

Metodi quantitativi

- Determinare il valore di "bias" (recupero del metodo rispetto a coltura pura) verificando la stessa matrice dello step 1

ISO 16140-3 All. B : matrici «challenging». / ISO 16140-3 All. C : preparazione e inoculazione campioni di verifica.

Scopo del metodo
Scopo della validazione
Scopo del laboratorio

Campo di applicazione, di validazione, di uso

Il caso dei metodi validati

Del metodo

Campo di applicazione

Dichiarazione di applicabilità del metodo a... *food, feed, env.samples...*

Della validazione

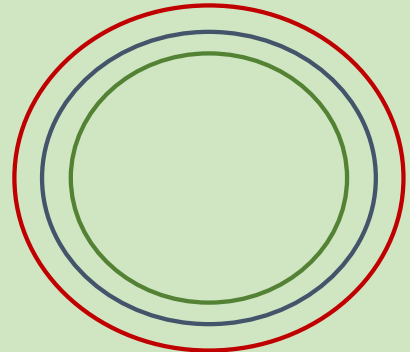
Campo della validazione

Lista definite di categorie e tipi di alimenti (o altro) oggetto dello studio di validazione

Del laboratorio

Campo di uso

Categorie e tipi di alimenti (o altro) validati e che il laboratorio dichiara di analizzare



Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Campo di applicazione, di ~~validazione~~, di uso

Il caso dei metodi di referenza non validati

Del metodo

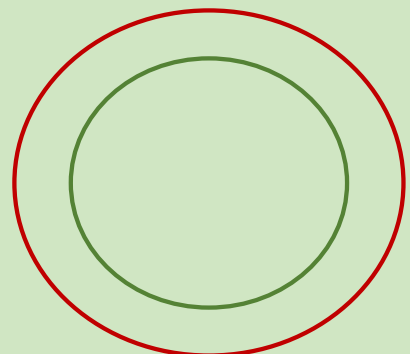
Campo di applicazione

Dichiarazione di applicabilità del metodo a... *food, feed, env.samples...*

Del laboratorio

Campo di uso

Categorie e tipi di alimenti (o altro) validati e che il laboratorio dichiara di analizzare



Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Categorie e tipi di alimenti : ISO 16140-3, all.A

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	Ready-to-eat, ready-to-reheat meat 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	Dried cereals, fruits, nuts, seeds and vegetables
Infant formula and infant cereals	Chocolate, bakery products and confectionary	Multi-component foods or meal components	Pet food and animal feed	Environmental samples (food or feed production)	Primary production samples (PPS)

Identico alla tabella A.1 di ISO 16140-2:2016

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Scopo del metodo: *limited and broad range of foods*

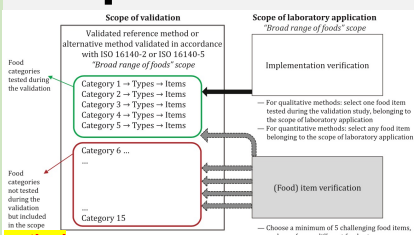


Figure 4 — Food items required when verifying a method for a "broad range of foods" scope

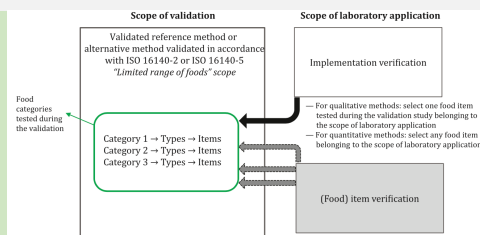


Figure 5 — Food items required when verifying a method for a "limited range of foods" scope

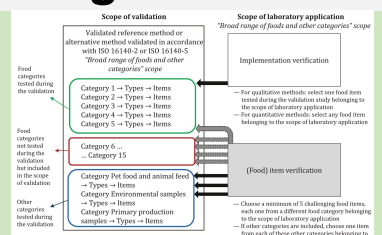


Figure 6 — Items required when verifying a method for a "broad range of foods and other categories" scope

Le figure di pag.6, 7, 8 e la tabella di pagina 8 **dovrebbero** contribuire a fare chiarezza...

Fig. 4 : il «campo d'uso» del laboratorio è solo «food» per un metodo validato **formalmente** su un «broad range of foods» => Il laboratorio verifica 1 matrice (step 1) + altre 5 (step 2) e ha la possibilità di operare in un «campo d'uso» esteso a tutte **categorie/tipi** in Tab.A-1 di ISO 16140-2

Fig.5 : il «campo d'uso» del laboratorio è solo «food» per un metodo validato su un «limited range of foods» => Il laboratorio verifica 1 matrice (step 1) + altre (poche) matrici (step 2) del suo «campo d'uso».

Fig.6 : il «campo d'uso» del laboratorio è «food» + altre matrici (e.g. : petfood, ambiente,...) per un metodo validato su un «broad range of foods + other categories» => Il laboratorio verifica 1 matrice (step 1) + 1 matrice per ognuna delle matrici del suo «campo d'uso», food e non, e ha la possibilità di operare in un «campo d'uso» esteso a tutte **categorie/tipi** in Tab.A-1 di ISO 16140-2

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Scopo del metodo: *limited and broad range of foods*

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
<u>"Broad range of foods"</u> scope ≥ 5 food categories	1	≥ 5	≥ 6
<u>"Limited range of foods"</u> scope N_{food} categories	1	$N_{\text{food}} \leq 4$	$(N_{\text{food}} + 1) \leq 5$
<u>"Broad range of foods"</u> + <u>other categories (N_{other}) scope</u>	1	≥ 5 food items + 1 item from each of the N_{other} other categories	$\geq 6 + N_{\text{other}}$
<u>"Limited range of foods"</u> 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	$N_{\text{other}} \leq 3$	$(N_{\text{other}} + 1) \leq 4$



Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Scopo: *broad range of foods and other categories*

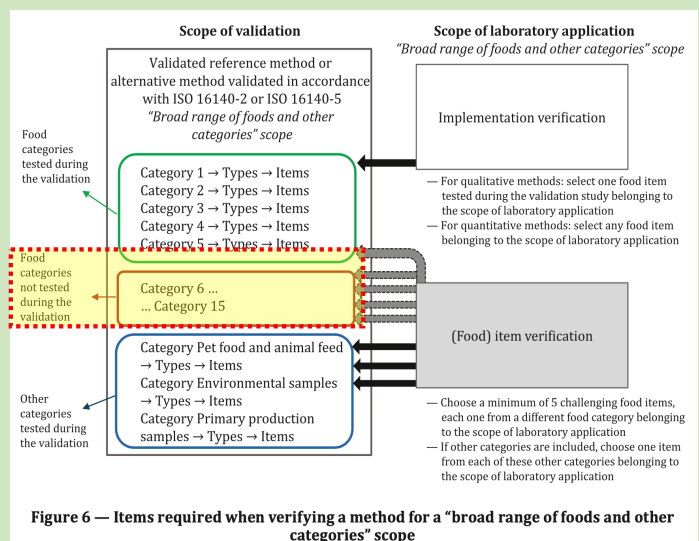
Il laboratorio verifica solo le categorie/tipi nel suo «campo d'uso». Non vi è obbligo di verificare le categorie/tipi che non si trovino nello stesso.

Vi è pero una forzatura nella dichiarazione di metodo validato su una «broad range of foods», cioè validato su almeno 5 delle 15 categorie della tabella A.1 di ISO 16140-2.

Si presume che un tale metodo produca prestazioni identiche su TUTTE le categorie della tabella A.1 e quindi è «validato» per l'uso su 15 categorie (e loro tipi).

Ne siamo sicuri ?

Se la verifica fallisce ripetutamente per una o più matrici, che conclusione ne traiamo ?...



Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Il «periodo di transizione»

Chiarimenti:

- verifica dei metodi già in essere in laboratorio
- verifica dei metodi di riferimento non validati
- verifica di metodi oggetto di revisione

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Cosa è successo con la pubblicazione di ISO 16140-3 ?

- **Premessa** : solo metodi validati possono essere verificati dacché servono i dati di validazione per poter misurare la competenza del laboratorio a eseguire il metodo.
- **Cosa succede ai metodi di riferimento privi di validazione ?**
- **Fino al 31 dicembre 2027** : i laboratori possono implementare e verificare metodi di riferimento ISO o CEN non validati applicando le istruzioni dell'allegato F di ISO 16140-3
- **Dal 1 gennaio 2028** : solo i metodi di riferimento validati potranno essere verificati; se non validati, i metodi ISO o CEN dovranno essere validati dal laboratorio che vorrà implementarli.

Pro memoria: le norme ISO sono norme volontarie, ISO le sviluppa e le pubblica ma non ha alcuna autorità sulla loro implementazione.

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Il documento ISO sul periodo di transizione

version: 2021-01-19

Transition period for the implementation of ISO 16140-3

1 Introduction

During the transition period, this document is intended to be used for the implementation of ISO 16140-3, *Microbiology of the food chain – Method validation – Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory*.

It provides information on the verification of methods that is permitted during the transition period (until 2027-12-31) as agreed by ISO/TC 34, *Food products*, SC 9, *Microbiology*, and CEN/TC 463, *Microbiology of the food chain*. This transition period is provided because some reference methods are not yet (fully) validated and will give standardization organizations (including ISO and CEN committees) time to validate their reference methods.

This document and ISO 16140-3 are intended to be used by:

- user laboratories (accredited and non-accredited);
- (technical) assessors involved in the evaluation of verification data generated for reference methods and validated alternative methods;
- accreditation bodies.

It can also be useful for regulatory authorities, risk managers and customers.

2 General principles for the transition period

The general principle for verification is that the method to be verified (either alternative or reference) has been validated. However, some reference methods (including ISO or CEN standards) are not yet (fully) validated.

The transition arrangement is as follows:

- until 2027-12-31, user laboratories may perform method verification of non-validated reference methods and in accordance with ISO 16140-3:2021, Annex F;
- from 2028-01-01, only validated reference methods are applicable for method verification (see ISO 16140-3:2021, Clauses 5 or 6). This means that when reference methods (including ISO or CEN standards) are introduced in a laboratory and they have not been validated (no performance characteristics are included), they shall be validated before a verification can be performed in accordance with ISO 16140-3.

For the implementation of ISO 16140-3, a differentiation is made between methods in these situations:

- methods already accredited under the scope of laboratory application (see Clause 3 shown below);
- methods or (food) categories new to the laboratory (see Clause 4 on the next page);
- methods that have been revised after they have been accredited under the scope of laboratory application (see Clause 5 on the next page).

NOTE The word 'accredited' is used above as accredited laboratories have to verify or validate their methods before implementation and obtaining accreditation (see ISO/IEC 17025:2017, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*).

3 Methods already accredited under the scope of laboratory application

Validated (reference or alternative) methods accredited under the scope of laboratory application, for which a verification had already been conducted before the publication of ISO 16140-3, do not need to be re-verified in accordance with the principles of ISO 16140-3 upon publication of this International Standard. However, they may be required to be re-verified, using ISO 16140-3, when changes are made to the method (see Clause 5).

NOTE During the transition period, this is also applicable to non-validated reference methods.

4 Methods or (food) categories new to the scope of laboratory application

Any validated method that is introduced into the laboratory, after the publication of ISO 16140-3, shall be verified in accordance with ISO 16140-3 before implementation.

New (food) categories of already accredited methods that are extensions to the existing scope of laboratory application shall also be verified before initiating routine testing. These new (food) categories shall have been included in the validation study, meaning they belong to the scope of validation.

NOTE During the transition period, this is also applicable to non-validated reference methods.

5 Methods that have been revised after they have been accredited under the scope of laboratory application

Specific requirements apply depending on whether they are validated reference methods (see a), non-validated reference methods (see b), or validated alternative methods (see c).

a) Validated reference methods: when ISO or CEN standards are revised, an evaluation is made of the impact of the technical revision on the performance characteristics. This is stated in the Introduction of the applicable International Standard. Several cases can be distinguished:

- a minor (technical) change does not require re-verification;
- a major (technical) change that, after re-validation, has no (or minor) impact on the performance characteristics, does not require re-verification;
- a major (technical) change that, after re-validation, has a major impact on the performance characteristics requires re-verification.

b) Non-validated reference methods: revised non-validated reference methods (including ISO or CEN standards) can only be used for verification during the transition period (see Clause 2). From 2028-01-01, only validated reference methods can be used for verification.

c) Validated alternative methods: changes to a validated alternative method that require re-validation or additional validation of the method, may also require re-verification of the method in accordance with ISO 16140-3.

NOTE It is the responsibility of the validation/certification bodies to decide on the extent of the re-validation once an alternative method is revised and if re-verification is needed.

Possible changes that require re-validation of the method and therefore also may require re-verification of the method include:

- a major (technical) change in the reference method(s) used to perform method validation;
- a major (technical) change or revision of ISO 16140-2:2016 (the protocol used for alternative method validation) or ISO 16140-6:2019 (the protocol used for alternative confirmation method validation);
- a change to the scope of the method (extensions or exclusions). The verification will be limited to the (food) categories that are included in the change of the scope of validation.
- technical changes to parameters or application (reagents, primers, incubation temperatures/times, etc.) of the alternative method that have been shown to affect the alternative method performance.

Tre fattispecie :

— methods already accredited under the scope of laboratory application (Clause 3)

— methods or (food) categories new to the laboratory (Clause 4)

— methods that have been revised after they have been accredited under the scope of laboratory application (Clause 5)

Fonte del documento ISO :
[https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/Transition period for the implementation of ISO 16140-3 version 20210119.pdf](https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/Transition%20period%20for%20the%20implementation%20of%20ISO%2016140-3%20version%2020210119.pdf)

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Punto 3 : metodi già in essere nel laboratorio

3 Methods already accredited under the scope of laboratory application

Validated (reference or alternative) methods accredited under the scope of laboratory application, for which a verification had already been conducted before the publication of ISO 16140-3, do not need to be re-verified in accordance with the principles of ISO 16140-3 upon publication of this International Standard.

However, they may be required to be re-verified, using ISO 16140-3, when changes are made to the method (see Clause 5).

NOTE During the transition period, this is also applicable to non-validated reference methods.

=> Principio fondamentale : ISO 16140-3 non è norma retroattiva.

=> Verifica non richiesta da di ISO 16140-3 per metodi già in uso e già verificati precedentemente.

=> Categorie/tipi di «campioni» nello scopo di validazione del metodo e «campo d'uso» del lab.

=> Più correttamente si sarebbe dovuto scrivere «However, they should be re-verified...»

Punto 4 : nuovi metodi, nuove categorie/(tipi)

4 Methods or (food) categories **new** to the **scope of laboratory application**

Any **validated method** that is introduced into the laboratory, **after the publication** of ISO 16140-3, shall be **verified** in accordance with ISO 16140-3 **before implementation**.

New (food) categories of **already accredited methods** that are **extensions to the existing scope of laboratory application** shall also be **verified before initiating routine testing**. Those new (food) categories shall have been included in the validation study, meaning they belong to the scope of validation.

NOTE During the transition period, this is also applicable to non-validated reference methods.

=> *Principio fondamentale : ISO 16140-3 non è norma retroattiva.*

=> *Nuovi metodi validati = metodi verificandi.*

=> *Come punto 3 : categorie/tipi di «campioni» nello scopo di validazione del metodo e «campo d'uso» del lab.*

=> *Verifica prima della «industrializzazione» del metodo.*

=> *Estensione di categorie/tipi validati : non implica verifica se queste categorie/tipi validati non sono nel «campo d'uso» del laboratorio.*

Punto 5 a : metodi accreditati e verificati, poi rivisti

5 Methods that have been **revised after they have been accredited under the scope of laboratory application**

=> *metodi già accreditati e verificati, andati in revisione, le cui categorie / tipi di campioni sono nel «campo d'uso» del laboratorio.*

a) **Validated reference methods**: when ISO or CEN standards are revised, an evaluation is made of the impact of the technical revision on the performance characteristics. This is stated in the Introduction of the applicable International Standard.

=> *la necessità della ri-verifica sarà sancita da ISO e/o CEN, non da altri soggetti.*

Diversi casi possibili :

- **NO RI-VERIFICA** : Modifiche tecniche minori => e.g. : *una opzione nella conferma di un metodo.*

- **NO RI-VERIFICA** : Modifiche tecniche maggiori dopo rivalidazione che non hanno impatto, o minimo, sulle prestazioni del metodo => e.g. : *???*

- **RI-VERIFICA** : Modifiche tecniche maggiori dopo rivalidazione che hanno impatto maggiore sulle prestazioni del metodo => e.g. *ISO 22964 1° e 2° versione.*

Punto 5 b : metodi accreditati e verificati, poi rivisti

5 Methods that have been revised after they have been accredited under the scope of laboratory application

=> metodi già accreditati e verificati, andati in revisione, le cui categorie / tipi di campioni sono nel «campo d'uso» del laboratorio.

b) Non-validated reference methods: revised non-validated reference methods (including ISO or CEN standards) can only be used for verification during the transition period (see Clause 2). From 2028-01-01, only validated reference methods can be used for verification.

=> questa è una deroga importante, pena la morte dei metodi ISO.

=> Meglio scrivere : «non-validated reference methods can be verified during the transition period until Dec.31 2027»...

=> Tecnicamente, per le verifiche si deve considerare che LOD50 del metodo sia 1 cfu / porzione analitica.

=> In altre parole : metodi ISO o CEN non validati prima del 31.12.27 dovranno poi essere VALIDATI dai singoli utenti.

=> Senza uno studio inter-laboratorio, non potranno essere usati da altri laboratori.

=> Il «validatore» non dovrà eseguire verifica poiché ha prodotto le caratteristiche di prestazione del metodo.

=> Tempi e costi cospicui...

=> In riferimento a quale metodo potranno essere validati i metodi alternativi se il metodo di referenza non lo sarà ?

=> È sempre vero, corretto e accurato dire che la LOD50 è 1 cfu / p.a. ? NO

=> Quale è la porzione analitica corretta da cui partire ? 5g ? 10g ? 25g ? 250g ? 375 ? La sensibilità è ignota...

Punto 5 c : metodi accreditati e verificati, poi rivisti

5 Methods that have been revised after they have been accredited under the scope of laboratory application

=> metodi già accreditati e verificati, poi rivisti e con categorie/tipi di campioni sono nel «campo d'uso».

c) Validated alternative methods: changes to a validated alternative method that require re-validation or additional validation of the method, may also require re-verification of the method in accordance with ISO 16140-3.

NOTE It is the responsibility of the validation/certification bodies to decide on the extent of the re-validation once an alternative method is revised and if re-verification is needed.

=> la necessità della ri-verifica sarà sancita dall'ente validatore/certificatore, non da altri soggetti.

Diversi casi possibili :

- a major (technical) change in the reference method(s) used to perform method validation => cambia ISO, cambia il confronto tra questo e il metodo alternativo (nuova validazione)
- a major (technical) change or revision of ISO 16140-2:2016 or ISO 16140-6:2019 => cambiano le norme tecniche di validazione dei metodi alternativi
- a change to the scope of the method (extensions or exclusions). The verification will be limited to the (food) categories that are included in the change of the scope of validation => cambia lo scopo di validazione del metodo, si verificano le nuove matrici **MA SOLO SE NEL CAMPO D'USO**
- technical changes to parameters or application (reagents, primers, incubation temperatures/times, etc.) of the alternative method that have been shown to affect the alternative method performance => modifiche tecniche maggiori, cambio delle prestazioni del metodo

Esempio di verifica di un metodo qualitativo

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Matrici validate in ISO 6579-1:2017 e LOD50

Il protocollo usato per lo step 1 e lo step 2 deve essere il medesimo

Table C.1 – Results of data analysis obtained with fresh cheese curd samples

Parameter	Fresh cheese curd (blank)	Fresh cheese curd (low level contamination) ^a	Fresh cheese curd (high level contamination) ^a
Number of participating collaborators	23	23	23
Number of samples per collaborator	5	5	5
Number of collaborators retained after evaluation of the data	21	21	21
Number of samples retained after evaluation of the data	105	105	105
Test portion size, in g	25	25	25
Specificity, in %	100	—	—
Sensitivity, in %	—	74,3	83,8
LOD ₅₀ (95 % confidence interval), in cfu/test portion	—	5,7 (4,0 to 8,1)	

^a Cheese samples were artificially contaminated with *Salmonella* Montevideo (lactose positive strain).

Most probable number (MPN) results of the artificially contaminated samples were the following:

MPN/25 g

Low level 0,7 (0,2 to 2,4)

High level 37,2 (7,5 to 95,0)

Innanzitutto occorre ottenere la LOD₅₀ della validazione per la matrice in verifica

cagliata fresca
5,7 cfu/p.a.

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Scelta del protocollo di verifica

Table 3 → Protocols to determine eLOD₅₀ and number of replicates needed per inoculation level

Protocol	Inoculation level of the test portion					Total number of replicates
	High level 9 × LOD ₅₀ / test portion	Intermediate level 3 × LOD ₅₀ / test portion	Low level 1 × LOD ₅₀ / test portion 5,7	3 cfu to 5 cfu /test portion	Blank	
1	1	4	4	–	1	10
2	–	3	5	–	1	9
3	–	–	–	7	1	8

NOTE The abbreviation of colony forming units is **Protocollo 3 : «adattare» l'inoculo alla LOD50 del metodo ove questa fosse elevata.**

- **Protocollo 1:** raccomandato quando il laboratorio non ha certezza di ottenere il livello di cfu richiesto per l'inoculo
- **Protocollo 2:** raccomandato se il protocollo 1 non ha fornito dati validi e si deve ripetere lo studio di verifica
- **Protocollo 3:** il più semplice! Uso di prodotti (ceppi, colture, pellet) di riferimento, certificati o no, con livello cfu noto
- La preparazioni degli inoculi stabili in fase stazionaria non è semplice, richiede esperienza e conoscenza specifiche.
- Il livello di inoculazione va verificato parallelamente all'inoculazione dei campioni, pena il cambio di livello di cfu.
- Errori di inoculo frequenti : livello cfu troppo basso o assente, FALSI NEGATIVI di natura tecnica.
- Il metodo più accurato per la stima del livello cfu dell'inoculo è il metodo MPN e non il metodo in piastra.
- Un laboratorio QC aziendale deve manipolare colture di patogeni (rischio di contaminazione!... **Ceppi surrogati?**)

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Calcoli tabellari

Inoculo elevato : $9 \times 5,7 = 54$ cfu/p.a.
 Inoculo intermedio : $3 \times 5,7 = 18$ cfu/p.a.
 Inoculo basso : $1 \times 5,7 = 6$ cfu/p.q.

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
Inoculo in cfu per ognuno dei tre livelli				0,5 × 6 (LIL)
54	18	6 (LIL)		eLOD₅₀ = 3,0

^a LIL: Low inoculation level

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Criteri di accettabilità e risultati

Metodi validati, LOD50 disponibile

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 _R	S _R ≤ 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_R ≤ 2 × S_R for validation studies with only one S_R value.

La eLOD₅₀ deve essere ≤ 4 × la LOD₅₀ della validazione

$$4 \times 5,7 \text{ (LOD}_{50}\text{)} = 22,8 \text{ cfu}$$

Nell'esempio visto : eLOD50 3,0 cfu < 22,8 cfu.

La verifica ha avuto successo.

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Criteri di accettabilità e risultati

Metodi di referenza non validati, LOD50 non disponibile, per convenzione LOD50 = 1 cfu / p.a.

Table F.5 — Acceptability limits for the verification of non-validated reference methods

Method	Performance characteristics	Acceptability limits
Qualitative	eLOD ₅₀	For protocols 1 and 2: eLOD ₅₀ ≤ 4 cfu/test portion For protocol 3: ≥ 6 out of 7 positive results
Quantitative	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

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Esempio di verifica di un metodo quantitativo

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

ISO 21528-2 ‘Enterobacteriaceae’ Step 1 : verifica della implementazione

Category	Item	Characteristic
Chocolate, bakery and confectionary	Tiramisu	Validation study

- Basta una qualsiasi matrice tra quelle validate del metodo, **meglio se “challenging”**.
- Si usano campioni naturalmente contaminati oppure, ove necessario, si inoculano le sospensioni preparative dei campioni selezionati con inoculi a diverso livello del ceppo batterico opportuno.
- Il metodo va verificato includendo la eventuale conferma per ogni porzione analitica.
- Vanno analizzati almeno 10 campioni in duplicato, possibilmente di differenti lotti e in differenti condizioni di analisi (data, analista, lotti media e reagent, apparati,...)
- Si misura la **dev.st. della reproducibilità intralaboratorio (S_{IR})** (ref ISO 19036:2019).

Table 11 — Calculation of S_{IR}

Laboratory sample number	Log ₁₀ result A $y_{IA} = \log_{10}(x_{IA})$	Log ₁₀ result B $y_{IB} = \log_{10}(x_{IB})$	Absolute difference $ y_{IA} - y_{IB} $	Squared difference $ y_{IA} - y_{IB} ^2$
1	≤ 1,602 1	≤ 1,602 1	Not used	Not used
2	2,041 4	2,260 1	0,218 7	0,047 8
3	2,612 8	2,792 4	0,179 6	0,032 3
4	2,806 2	2,518 5	0,287 7	0,082 8
5	2,838 8	2,755 9	0,083 0	0,006 9
6	2,892 1	2,806 2	0,085 9	0,007 4
7	2,792 4	3,113 9	0,321 6	0,103 4
8	2,939 5	3,176 1	0,236 6	0,056 0
9	3,934 5	3,806 2	0,128 3	0,016 5
10	4,204 1	3,699 0	0,505 1	0,255 2
11	> 4,176 1	4,127 1	Not used	Not used
12	4,301 0	4,505 1	0,204 1	0,041 7
			Sum	0,650 0
			Sum/(2 × 10)	0,032 5
			$S_{IR} = \sqrt{0,032 5}$	0,18

— The calculated S_{IR} value of 0,18 is compared to the results of the validation study (data taken over from ISO 21528-2). Table 12 lists the S_R values obtained from that validation study.

The user laboratory has examined 12 laboratory samples of tiramisù for the level of *Enterobacteriaceae* (using ISO 21528-2) following the experimental design given in Figure 7. The results (calculated as cfu/g in test portions A and B of the laboratory sample) given in Table 10 were obtained.

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Criteri di accettabilità e risultati

Table 12 — Summary of S_R values from the validation study for ISO 21528-2

(Food) item	S_R values from the validation study			Mean value of three inoculation levels
	Low inoculation level	Intermediate inoculation level	High inoculation level	
Egg product	0,32	0,50	0,48	0,43
Raw meat	0,28	0,36	0,57	0,40
Animal feed	0,18	0,17	0,20	0,18
Pasteurized milk	0,24	0,18	0,19	0,20
Tiramisu	0,22	0,28	0,13	0,21

S_{IR} deve essere $\leq 2 \times$ il valore S_R medio più basso (in caso di valori multipli),
oppure $\leq 2 \times S_R$ medio (in caso di valore unico)

$$2 \times S_R \text{ medio più basso} = 2 \times 0,18 = \mathbf{0,36}$$

$$S_{IR} \text{ ottenuto} = \mathbf{0,18}$$

$$\text{Nell'esempio visto : } \mathbf{0,18} \leq \mathbf{0,36}$$

La verifica di implementazione ha avuto successo.

Ove S_R non fosse disponibile, si procede alla sola stima dell'eBIAS (step 2)

ISO 21528-2 *Enterobacteriaceae* Step 2 : verifica della matrice: bias stimato (*eBias*)

È in sostanza il recupero del metodo quantitativo rispetto ad una coltura pura in sospensione, a tre diversi livelli di inoculo in campioni duplicati per ogni livello di inoculo.

1. Selezione della matrice (la stessa usata in step 1)
2. Contaminazione artificiale (3 livelli di contaminazione)
 - Possibilmente campioni di diversi lotti
 - Campioni duplicati / livello inoculo
3. Conteggio (log cfu) in piastra della coltura e dei campioni inoculati
4. Saggio di porzione non inoculata per misurare la presenza di flora naturale

Criteria di accettabilità e risultati

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.

La differenza assoluta tra il conteggio (log cfu) dell'inoculo nella p.a. e il conteggio (log cfu) dell'inoculo utilizzato deve essere $\leq 0,5 \log_{10}$ cfu/ml per ogni livello di contaminazione

Verifica dei metodi alternativi di conferma / tipizzazione

Verifica dei metodi alternativi validati per la conferma / tipizzazione (ISO 16140-6)

- Solo la verifica dell'implementazione
- Revisione dei dati di validazione del metodo
- Uso di un agar selettivo o non selettivo utilizzato nello studio di validazione
- Studio di inclusività ed esclusività dei ceppi selezionati
- Risultato : 100% concordanza

All. E di ISO 16140-3

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

**Il sito web pubblico di
ISO TC34/SC9**

Dr.S.Colombo – WG3/ISO TC34/SC9

Sito pubblico di ISO/TC 34/SC 9 'Microbiology'

- Documenti informativi su validazione e verifica dei metodi in relazione alle norme della serie ISO 16140
- Presentazione della serie ISO 16140
- Presentazione della ISO 16140-3
- Documenti di formazione su ISO 16140-3
- Documento sul periodo di transizione
- File Excel® per l'esecuzione dei calcoli di verifica
- Registrazione del seminario in rete del 2/3/2021

<https://committee.iso.org/home/tc34sc9>



Method validation and method verification

21 October 2020

Twitter Facebook LinkedIn

The ISO 16140 series is dedicated to the validation and verification of microbiological methods. These International Standards are designed to help food and feed testing laboratories, test kit manufacturers, competent authorities, and food and feed business operators to implement microbiological methods.

Learn more about ISO 16140 series, and the necessary stages of validation and verification of methods before use.

Development of the ISO 16140 series

The ISO 16140 series consists now of six parts with the general title, *Microbiology of the food chain - Method validation*: