



Norma ISO 16140-3- Verificación de métodos de referencia



María Jesús Zamora Escibano. Jefe se Servicio de Microbiología Alimentaria. mzamora@aesan.gob.es

Jornadas de Referencia CNA
14-15 de junio de 2022



AESAN ES 1/22. ENSAYO DE INTERCOMPARACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA EN PRODUCTO LÁCTEO. 3 de octubre de 2022

-AESAN SAL 2/22. ENSAYO DE INTERCOMPARACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE *Salmonella* spp EN MEJILLONES. 17 de octubre de 2022

-AESAN LM 3/22. ENSAYO DE INTERCOMPARACIÓN PARA EL RECuento DE *Listeria monocytogenes* EN QUESO. 12 de septiembre de 2022

-AESAN CPS 4/22. ENSAYO DE INTERCOMPARACIÓN DE RECuento DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA-POSITIVOS EN QUESO. 26 de septiembre de 2022



RELSA

INSCRIPCIÓN GSC

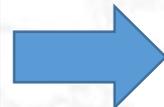


Art. 35 de la Ley 17/2011, de Seguridad Alimentaria y Nutrición

*“Se creará la Red de Laboratorios de Seguridad Alimentaria (RELSA), para **compartir y fomentar la acreditación** de laboratorios de ensayo y métodos analíticos para el control oficial. Formarán parte de la dicha red los **laboratorios, públicos o privados**, que participen en trabajos de **control oficial por designación** de las autoridades competentes de las comunidades autónomas o de la Administración General del Estado. Las distintas autoridades competentes deberán facilitar a ésta última la información relativa a dichos laboratorios y su cartera de servicios.*



REGLAMENTO (UE) 2017/625 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 15 de marzo de 2017 relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios,
REGLAMENTO (CE) No 882/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 29 de abril de 2004



22.12.2005 EN Official Journal of the European Union L 338/1

I

(Acts whose publication is obligatory)

COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005
of 15 November 2005
on microbiological criteria for foodstuffs

(Text with EEA relevance)

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES,

- (4) Microbiological criteria also give guidance on the acceptability of foodstuffs and their manufacturing, handling and distribution processes. The use of micro-

7.4.2017 ES Diario Oficial de la Unión Europea L 91/1

I
(Actos legislativos)

REGLAMENTOS

REGLAMENTO (UE) 2017/625 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO
de 15 de marzo de 2017

relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.º 999/2001, (CE) n.º 396/2005, (CE) n.º 1069/2009, (CE) n.º 1107/2009, (UE) n.º 1151/2012, (UE) n.º 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) n.º 1700/5 y (CE) n.º 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/56/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/130/CE del Consejo, y por el que se deroga los Reglamentos (CE) n.º 894/2004 y (CE) n.º 682/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/606/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo (Reglamento sobre controles oficiales)

(Texto pertinente a efectos del EEE)

EL PARLAMENTO EUROPEO Y EL CONSEJO DE LA UNIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea, y en particular su artículo 43, apartado 2, su artículo 114, y su artículo 168, apartado 4, letra b),

Vista la propuesta de la Comisión Europea,

Previa transmisión del proyecto de acto legislativo a los Parlamentos nacionales,

Visto el dictamen del Comité Económico y Social Europeo ⁽¹⁾,

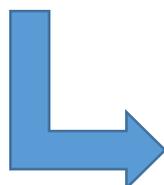
Visto el dictamen del Comité de las Regiones ⁽²⁾,

De conformidad con el procedimiento legislativo ordinario ⁽³⁾,

Considerando lo siguiente:

(1) El Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea (TFUE) exige que, al definirse y ejecutarse las políticas y acciones de la Unión, se garantice un alto nivel de protección de la salud humana y animal y del medio ambiente. El logro de este objetivo debe conseguirse mediante medidas en los ámbitos veterinario y fitosanitario, entre otros, que tengan como objetivo final la protección de la salud humana.

⁽¹⁾ DO C 67 de 6.3.2014, p. 164.
⁽²⁾ DO C 114 de 15.2.2014, p. 56.
⁽³⁾ Fisión del Parlamento Europeo de 15 de abril de 2014 (pendiente de publicación en el Diario Oficial) y posición del Consejo en primera lectura de 19 de diciembre de 2016 (pendiente de publicación en el Diario Oficial). Fisión del Parlamento Europeo de 15 de marzo de 2017 (pendiente de publicación en el Diario Oficial).



NORMAS ISO métodos de referencia



En 2006 el Grupo de Trabajo 3 «Validación del método» de la norma ISO/TC 34/SC 9 «Productos alimentarios — Microbiología» es responsable de las normas ISO de **validación y verificación** de métodos.

Desarrollo de la Norma ISO 16140 en diferentes partes:

Para dar **respuesta** al requisito establecido en la **Norma ISO 17025** «*El laboratorio verificará que puede realizar correctamente los métodos antes de introducirlos, velando por que pueda alcanzar el rendimiento requerido. Se conservarán los registros de la verificación.*»

Para **ofrecer protocolos más específicos** de validación o verificación de métodos de análisis cuantitativos y cualitativos, que sustituyen a la ISO de 16140:2003.

Para **armonizar** los criterios



ISO 16140/ UNE-EN ISO 16140 «Microbiología de la cadena alimentaria - Validación del método»:

Parte 1: Vocabulario

Parte 2: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) con respecto a un método de referencia

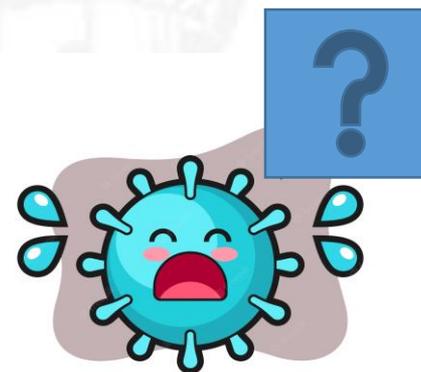
Parte 3: Protocolo para la verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados en un único laboratorio

Parte 4: Protocolo para la validación del método en un único laboratorio

Parte 5: Protocolo para la validación factorial interlaboratorio para métodos no propietarios

Parte 6: Protocolo para la validación de métodos alternativos (registrados) de confirmación microbiológica y procedimientos de tipado microbiológico.

Objeto y campo de aplicación: Verificación de métodos de referencia y métodos alternativos validados para su implementación en el laboratorio usuario. Es aplicable a la verificación de métodos utilizados para el análisis (detección y/o cuantificación), confirmación y tipificación de microorganismos (en particular, bacterias y hongos) presentes en: **productos destinados al consumo humano**, al consumo animal, **muestras ambientales de las áreas de producción y manipulación** de los anteriores, muestras de producción primaria.



La **verificación** se define como:

“*Demostración de que un método **validado** implementado por un usuario tiene un rendimiento conforme a las especificaciones del método determinadas en el estudio de validación y es adecuado para su uso previsto*”.

La verificación que aplica en el caso del CO de criterios microbiológicos:

MÉTODOS DE REFERENCIA (reconocido internacionalmente y ampliamente aceptado), las Normas ISO que se han validado mediante al menos un ejercicio de intercomparación.

Normas ISO sin validar



FUERA DE ESTE ALCANCE ISO 16140-3



Para verificar métodos de referencia que no han sido validados se emplea el Anexo F de la ISO 16140-3.

La normas ISO validadas han incluido un ANEXO informativo donde se recogen los estudios de validación del método y las características de funcionamiento.

Antes de planificar la verificación debemos:

- Estudiar el método validado
- Determinar el uso previsto
- Determinar el alcance específicos de los productos.



Tabla C.1 - Resultados del análisis de los datos obtenidos con muestras de cuajada de queso fresco

| Parámetro | Cuajada de queso fresco (blanco) | Cuajada de queso fresco (nivel bajo de contaminación) ^a | Cuajada de queso fresco (nivel alto de contaminación) ^a |
|--|----------------------------------|--|--|
| Número de colaboradores participantes | 23 | 23 | 23 |
| Número de muestras por colaborador | 5 | 5 | 5 |
| Número de colaboradores mantenidos tras la evaluación de los datos | 21 | 21 | 21 |
| Número de muestras mantenidas tras la evaluación de los datos | 105 | 105 | 105 |
| Tamaño de la porción para análisis, en g | 25 | 25 | 25 |
| Especificidad, en % | 100 | - | - |
| Sensibilidad, en % | - | 74,3 | 83,8 |
| LOD ₅₀ (intervalo de confianza al 95%), en cfu/porción para análisis | - | 5,7 (entre 4,0 y 8,1) | |
| ^a Las muestras de queso se contaminaron artificialmente con <i>Salmonella</i> Montevideo (cepa positiva para lactosa). Los resultados del número más probable (MPN; <i>most probable number</i>) de las muestras contaminadas artificialmente fueron las siguientes: MPN/25 g Nivel bajo 0,7 (entre 0,2 y 2,4) Nivel alto 37,2 (entre 7,5 y 95,0) | | | |

Determinar el alcance específico de los productos.

Es imposible en un estudio de validación analizar todos los alimentos, por lo que se considera válida cuando se validan 5 categorías de alimentos diferentes. Se espera que el método funcione para todos los alimentos.

Conocer :

- Alcance del método
- Alcance de la validación
- Alcance que va a utilizar el laboratorio.

El alcance de la validación debe estar de acuerdo al alcance del método y eso debe definir los alimentos que se deben verificar.





Hay dos tipos de verificaciones:

1.-Verificación de la implementación Sirve para demostrar que un laboratorio es **capaz de implementar** el método validado.

Compara los resultados obtenidos en la validación con los resultados obtenidos en la verificación. Por tanto debe demostrar que puede obtener resultados previstos en un artículo.

Métodos cualitativos seleccionar un artículo alimentario que se ha utilizado en la validación que pertenezca al alcance del laboratorio. Cuando los artículos incluidos en la validación NO ESTÁN en el alcance del laboratorio debe elegir uno, ya que el límite de detección está influido por el artículo/matriz.

Métodos cuantitativos elegir un artículo que pertenezca al alcance de validación del método, aunque no se haya utilizado en la validación.

1.-Verificación de la implementación



Revisar los datos de la validación.

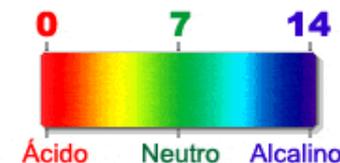
| Método | Nº de artículos alimentarios | Matriz utilizada en la validación | Se necesita para determinar el límite de detección |
|--------------|------------------------------|-----------------------------------|--|
| Cualitativo | 1 | Si, siempre | SI |
| Cuantitativo | 1 | No necesariamente | NO |

2.-Verificación de las matrices alimentarias demostrar que el laboratorio es capaz de analizar correctamente los alimentos incluidos en el alcance de acreditación.

Tabla 1 – Resumen del número mínimo de artículos (alimentarios) requeridos para la verificación

| Alcance de la validación | Número de muestras | | |
|---|-----------------------------------|--|---|
| | Verificación de la implementación | Verificación de artículos (alimentarios) | Total |
| Alcance de una “gama amplia de alimentos” ≥ 5 categorías de alimentos | 1 | ≥ 5 | ≥ 6 |
| Alcance de una “gama limitada de alimentos” categorías N_{alimento} | 1 | $N_{\text{alimento}} \leq 4$ | $(N_{\text{alimento}} + 1) \leq 5$ |
| Alcance de una “gama amplia de alimentos” + otras categorías (N_{otras}) | 1 | ≥ 5 artículos alimentarios + 1 artículo por cada una de las N_{otras} otras categorías | $\geq 6 + N_{\text{otras}}$ |
| Alcance de una “gama limitada de alimentos” Categorías N_{alimento} + otras categorías (N_{otras}) | 1 | $N_{\text{alimento}} \leq 4$ + artículo por cada una de las N_{otras} otras categorías | $(N_{\text{alimento}} + N_{\text{otras}} + 1) \leq 8$ |
| Alcance solo para otras categorías (N_{otras}) | 1 | $N_{\text{otras}} \leq 3$ | $(N_{\text{otras}} + 1) \leq 4$ |

El laboratorio debe seleccionar un alimento difícil por cada categoría incluida en su alcance.



ARTÍCULOS DIFÍCILES (Anexo B):

EFFECTOS DE LA MATRIZ

Características físico-químicas **composición**, p. ej., alto contenido en grasas, lecitina, espesante, contenido en nutrientes, **pH**, p. ej. $\text{pH} < 4$, **potencial de redox**, **actividad agua**, p. ej. $a_w < 0,85$, **estructura del alimento** como su viscosidad, **color**.



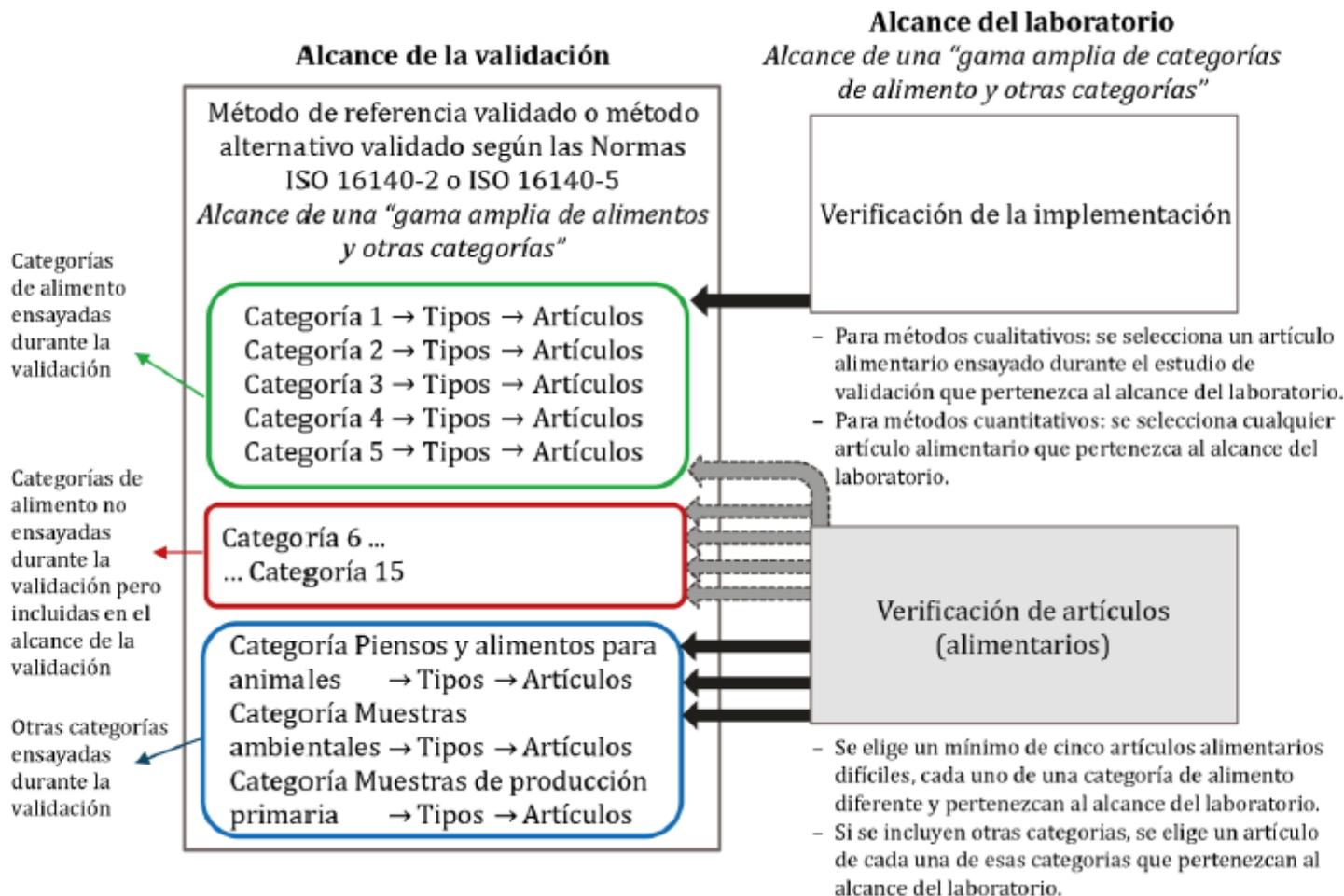
Características microbianas

- **muestras de microbiota basal elevada** p. ej. carne picada de aves de corral o leche cruda
- **microorganismos alterantes:** la presencia de esta microbiota natural puede influir en la recuperación y crecimiento del microorganismo objetivo
- **microbiota tecnológica** como cultivos microbianos fermentados y probióticos



Otras:

Componentes antimicrobianos e inhibidores del crecimiento, p. ej. Polifenoles
Procesos de fabricación que puedan alterar la viabilidad de los microorganismos
calor o presión.



CATEGORÍA DE ALIMENTOS PARA LA VERIFICACIÓN (Anexo A)

| | | | | | |
|--|--|---|--|---|---|
| Leche cruda y productos lácteos | Leche y productos lácteos sometidos a tratamiento térmico | Carne cruda y productos cárnicos para cocinar (excepto ave) | Productos cárnicos para listos para consumo o recalentar | Productos de ave de corral crudos y listos para cocinar | Productos de ave de corral listos para consumo o recalentar |
| Huevos y productos derivados del huevo | Pescado crudos y listos para cocinar (sin procesar) | Productos de la pesca listos para consumo o recalentar | Fruta y productos frescos | Frutas, verduras y hortalizas transformadas | Verduras y hortalizas, semillas, frutos secos, fruta y cereales secos |
| Fórmula infantiles y cereales | Chocolate, productos de panadería, pastelería y confitería | Alimentos de múltiples componentes o componentes de comidas | Alimentos para mascotas y alimentos para animales | Muestras ambientales MANIP ALIMENTOS | Muestras de producción primaria |

5 CATEGORÍAS DE ENSAYO

AMPLIA GAMA

+ OTRA CATEGORÍA

Tabla 2 - Características de rendimiento requeridas que se determinarán para la verificación

| Método | Características de rendimiento | Verificación de la implementación | Verificación de artículos (alimentarios) |
|-------------|--|-----------------------------------|--|
| Cualitativo | LOD ₅₀ estimado (eLOD ₅₀) | ✓ | ✓ |

Tabla 1 – Resumen del número mínimo de artículos (alimentarios) requeridos para la verificación

| Alcance de la validación | Número de muestras | | |
|---|-----------------------------------|--|---|
| | Verificación de la implementación | Verificación de artículos (alimentarios) | Total |
| Alcance de una “gama amplia de alimentos” ≥ 5 categorías de alimentos | 1 | ≥ 5 | ≥ 6 |
| Alcance de una “gama limitada de alimentos” categorías N_{alimento} | 1 | $N_{\text{alimento}} \leq 4$ | $(N_{\text{alimento}} + 1) \leq 5$ |
| Alcance de una “gama amplia de alimentos” + otras categorías (N_{otras}) | 1 | ≥ 5 artículos alimentarios + 1 artículo por cada una de las N_{otras} otras categorías | $\geq 6 + N_{\text{otras}}$ |
| Alcance de una “gama limitada de alimentos” Categorías N_{alimento} + otras categorías (N_{otras}) | 1 | $N_{\text{alimento}} \leq 4$ + artículo por cada una de las N_{otras} otras categorías | $(N_{\text{alimento}} + N_{\text{otras}} + 1) \leq 8$ |
| Alcance solo para otras categorías (N_{otras}) | 1 | $N_{\text{otras}} \leq 3$ | $(N_{\text{otras}} + 1) \leq 4$ |

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA VERIFICAR MÉTODO CUALITATIVO:

La norma propone tres protocolos en función del inóculo utilizado.
Necesario el valor LOD_{50} para ambas verificaciones

Tabla 3 - Protocolos para determinar el $eLOD_{50}$ y el número de réplicas necesarias por nivel de inoculación

| Protocolo | Nivel de inoculación de la porción para análisis | | | | | |
|-----------|---|--|---|--|--------|-----------------------------|
| | Nivel alto $9 \times LOD_{50}$ / porción para análisis | Nivel intermedio $3 \times LOD_{50}$ / porción para análisis | Nivel bajo $1 \times LOD_{50}$ / porción para análisis | 3 ufc a 5 ufc/ porción para análisis | Blanco | Número total de réplicas |
| 1 | 1 | 4 | 4 | - | 1 | 10 |
| 2 | - | 3 | 5 | - | 1 | 9 |
| 3 | - | - | - | 7 | 1 | 8 |

En el 1 el inóculo se prepara utilizando un cultivo

En el 3 el inóculo se prepara utilizando material de referencia cuantificado

El 2 se lleva a cabo cuando el primer protocolo seleccionado no funciona.

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA VERIFICAR MÉTODO CUALITATIVO:

Inóculo: Cultivo de una cepa o material referencia cuantificado.

Cultivo implica > trabajo y aumentar el n° de experimentos.

Para obtener los niveles de contaminación se realizan diluciones 1:3 desde un nivel anterior.

Tabla C.1 – Resultados del análisis de los datos obtenidos con muestras de cuajada de queso fresco

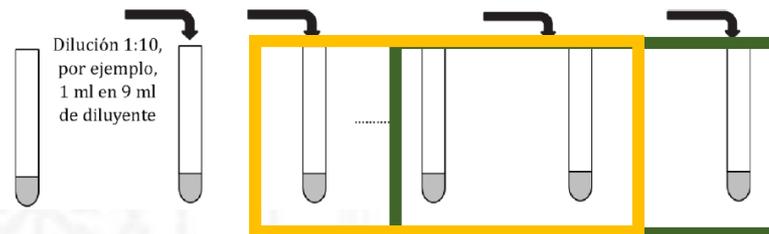
| Parámetro | Cuajada de queso fresco (blanco) | Cuajada de queso fresco (nivel bajo de contaminación) ^a | Cuajada de queso fresco (nivel alto de contaminación) ^a |
|---|----------------------------------|--|--|
| Número de colaboradores participantes | 23 | 23 | 23 |
| Número de muestras por colaborador | 5 | 5 | 5 |
| Número de colaboradores mantenidos tras la evaluación de los datos | 21 | 21 | 21 |
| Número de muestras mantenidas tras la evaluación de los datos | 105 | 105 | 105 |
| Tamaño de la porción para análisis, en g | 25 | 25 | 25 |
| Especificidad, en % | 100 | - | - |
| Sensibilidad, en % | - | 74,3 | 83,8 |
| LOD ₅₀ (intervalo de confianza al 95%), en cfu/porción para análisis | - | 5,7 (entre 4,0 y 8,1) | - |

a Las muestras de queso se contaminaron artificialmente con *Salmonella* Montevideo (cepa positiva para lactosa). Los resultados del número más probable (MPN; *most probable number*) de las muestras contaminadas artificialmente fueron los siguientes:

| | |
|------------|-------------------------|
| MPN/25 g | |
| Nivel bajo | 0,7 (entre 0,2 y 2,4) |
| Nivel alto | 37,2 (entre 7,5 y 95,0) |

$$\begin{aligned} \text{LOD}_{50} \times 9 &= 22,5 \text{ ufc} \\ \text{LOD}_{50} \times 3 &= 7,5 \text{ ufc} \\ \text{LOD}_{50} \times 1 &= 2,5 \text{ ufc} \end{aligned}$$

:3
:3



Si no se ha determinado el LOD₅₀ para una matriz se toma el valor <1,0 ufc/porción de análisis.

Con los resultados obtenidos de los ensayos se aplican tablas según el número de positivos o negativos.



DISEÑO EXPERIMENTAL PARA VERIFICAR MÉTODO CUALITATIVO:

Criterios de aceptación

Los resultados de el LOD_{50} obtenidos en verificación cuando se aplican los protocolos 1 y 2 se comparan con el LOD_{50} de la validación.

NO DEBE SER $> 4X LOD_{50}$

Los resultados cuando se utiliza el protocolo 3 se evalúan teniendo en cuenta que al menos 6 de las 7 muestras son positivas.

SI EL BLANCO ES POSITIVO O LOS PROTOCOLOS NO HAN FUNCIONADO SE DEBE REPETIR LA VERIFICACIÓN.

Protocolo1

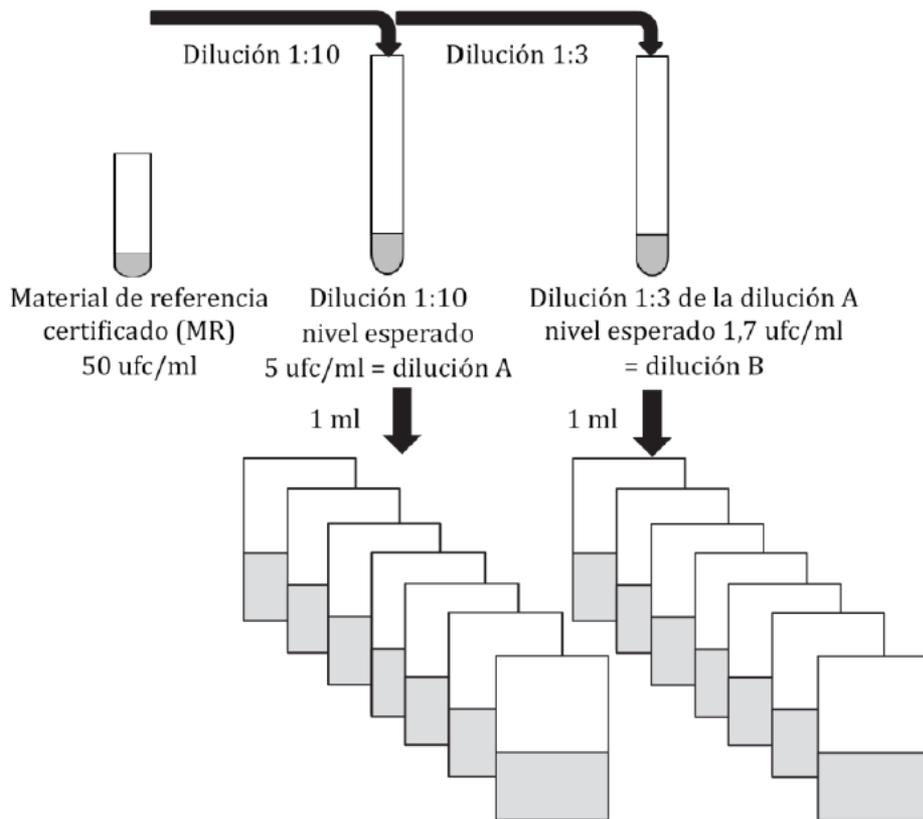
| Nivel alto de inoculación objetivo $9 \times LOD_{50}$ /porción para análisis | Nivel intermedio de inoculación objetivo $3 \times LOD_{50}$ /porción para análisis | Nivel bajo de inoculación objetivo $1 \times LOD_{50}$ /porción para análisis | Nivel en blanco | e LOD_{50} ufc/porción para análisis |
|--|--|--|-----------------|---|
| 1/1 | 4/4 | 4/4 | 0/1 | $< 1,0 \times LIL^a$ |
| 1/1 | 4/4 | 3/4 | 0/1 | $= 0,5 \times LIL$ |
| 1/1 | 4/4 | 2/4 | 0/1 | $= 0,7 \times LIL$ |
| 1/1 | 4/4 | 1/4 | 0/1 | $= 1,0 \times LIL$ |

$0,5 \times 5 = 2,5$

LOD_{50} Norma 5,7

| 45 ufc/porción e | 15 ufc/porción e | 5 ufc/porción e | 0 ufc/prción e | Resultado del inóculo del laboratorio |
|------------------|------------------|-----------------|----------------|---------------------------------------|
|------------------|------------------|-----------------|----------------|---------------------------------------|

LOD_{50} debe ser $\leq 5,7 \times 4 = 22,8$ ufc CUMPLE



Ejemplo protocolo 3 empleando un cultivo

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA VERIFICAR MÉTODO CUANTITATIVO:

Determinación de la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}). Sólo para la implemetación.

Se realiza en un solo laboratorio y la reproducibilidad se expresa como la S_{IR} .

La determinación de S_{IR} corresponde a la determinación de la incertidumbre técnica y se basa en el apartado 5.2.2 de la ISO 19036:2019.

Consideraciones generales:

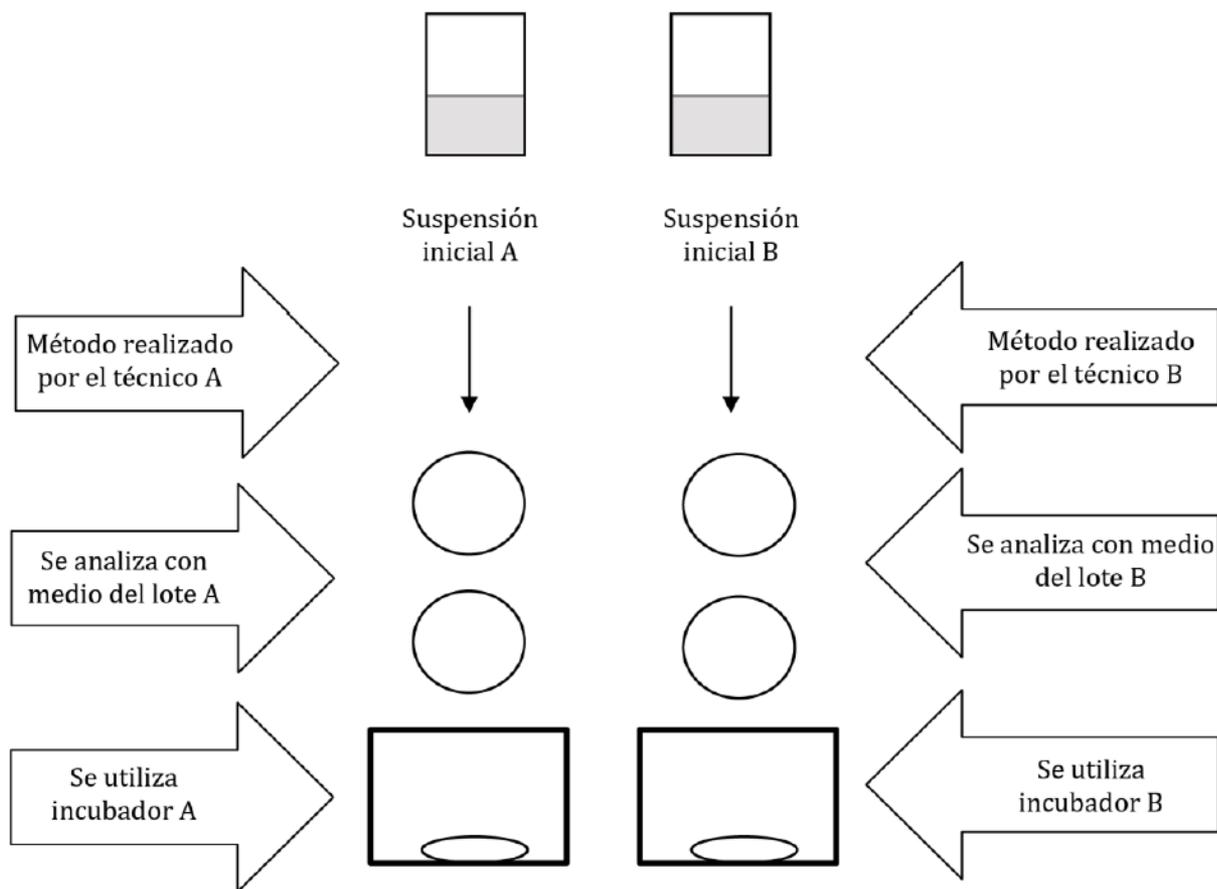
- Se requieren **al menos 10 muestras** de laboratorio pertenecientes la misma matriz alimentaria. Cada una de ellas se dividirá luego en 2 porciones.
- Seleccionar niveles de contaminación representativos del rango de contaminación natural observado.
- Homogeneizar la muestra antes de tomar las dos porciones para el análisis para distribuir uniformemente los microorganismos.
- Si se utiliza contaminación artificial, se inocula la suspensión inicial de cada porción para análisis con un nivel conocido.

Las **condiciones** de ensayo utilizadas durante el **análisis** de las dos porciones para análisis deben ser lo **más diferentes** posible, es decir incluir diferencias en los técnicos, los lotes de medios y reactivos, los dispositivos.





DISEÑO EXPERIMENTAL PARA VERIFICAR MÉTODO CUANTITATIVO:



LA MUESTRA SE DIVIDE EN DOS PORCIONES



DISEÑO EXPERIMENTAL PARA VERIFICAR MÉTODO CUANTITATIVO:

1.-VERIFICACIÓN IMPLEMENTACIÓN

Selección del artículo (alimentario)/matriz alimentaria.

La S_{iR} es independiente de la matriz por el diseño del ensayo, se puede seleccionar cualquiera del alcance de la validación, se recomienda uno que pueda homogeneizarse eficazmente.

Contaminación natural. Utilizarla siempre que sea posible. Las porciones analizadas deben tener niveles de contaminación representativos. Si el nivel esperado es **<10 ufc/g** en la porción para análisis, se utiliza contaminación artificial.

Contaminación artificial. Se siguen las mismas indicaciones que para la contaminación de los métodos cualitativos.

Evaluación de resultados. La S_{iR} se calcula a partir de al menos 10 muestras de laboratorio, es aconsejable analizar más de 10 muestras por si hay que descartar alguna.

Para los criterios de aceptabilidad las muestras que están por encima o debajo de los límites de aceptabilidad de la norma ISO 7218 no se pueden utilizar para el cálculo de la S_{iR} .

Límite de aceptabilidad.

La S_{iR} del método verificado debe ser $\leq 2 \times$ el valor medio más bajo de la desviación estándar de la reproducibilidad interlaboratorio (S_R) de los artículos (alimentarios) utilizados en el estudio de validación.

DISEÑO EXPERIMENTAL PARA VERIFICAR MÉTODO CUANTITATIVO:

Table E.1 — Results of data analysis obtained with cold-smoked salmon

| Parameter | Cold-smoked salmon (contamination level of <i>Listeria monocytogenes</i>) | | |
|---|--|-------------------------------|------------------------------|
| | 110 cfu/g (low level) | 1 300 cfu/g (medium level) | 13 000 cfu/g (high level) |
| Number of participating collaborators | 15 | 15 | 15 |
| Number of collaborators retained after evaluation of the data | 15 | 14 | 15 |
| Number of samples tested | 30 | 30 | 30 |
| Number of samples retained after evaluation of the data | 30 | 28 | 30 |
| Mean value Σa (\log_{10} cfu/g) | 1,85 | 3,04 | 3,95 |
| Repeatability standard deviation s_r (\log_{10} cfu/g) | 0,13 | 0,10 | 0,12 |
| Repeatability limit r : | — | — | — |
| as difference on \log_{10} scale (\log_{10} cfu/g) | 0,37 | 0,28 | 0,32 |
| as ratio on normal scale (cfu/g) | 2,33 | 1,92 | 2,10 |
| Reproducibility standard deviation s_R (\log_{10} cfu/g) | 0,18 | 0,19 | 0,19 |
| Reproducibility limit R : | — | — | — |
| as difference on \log_{10} scale (\log_{10} cfu/g) | 0,51 | 0,53 | 0,54 |
| as ratio on normal scale (cfu/g) | 3,26 | 3,37 | 3,44 |

Los límites de aceptación son: S_{IR} del método verificado debe ser $\leq 2 \times$ el valor medio más bajo de la desviación estándar del método validado.

El valor más bajo de la S_R es 0,18, por lo tanto $2 \times 0,18 = 0,36$. La S_{IR} del método validado debe ser $\leq 0,36$.



DISEÑO EXPERIMENTAL PARA VERIFICAR MÉTODO CUANTITATIVO:

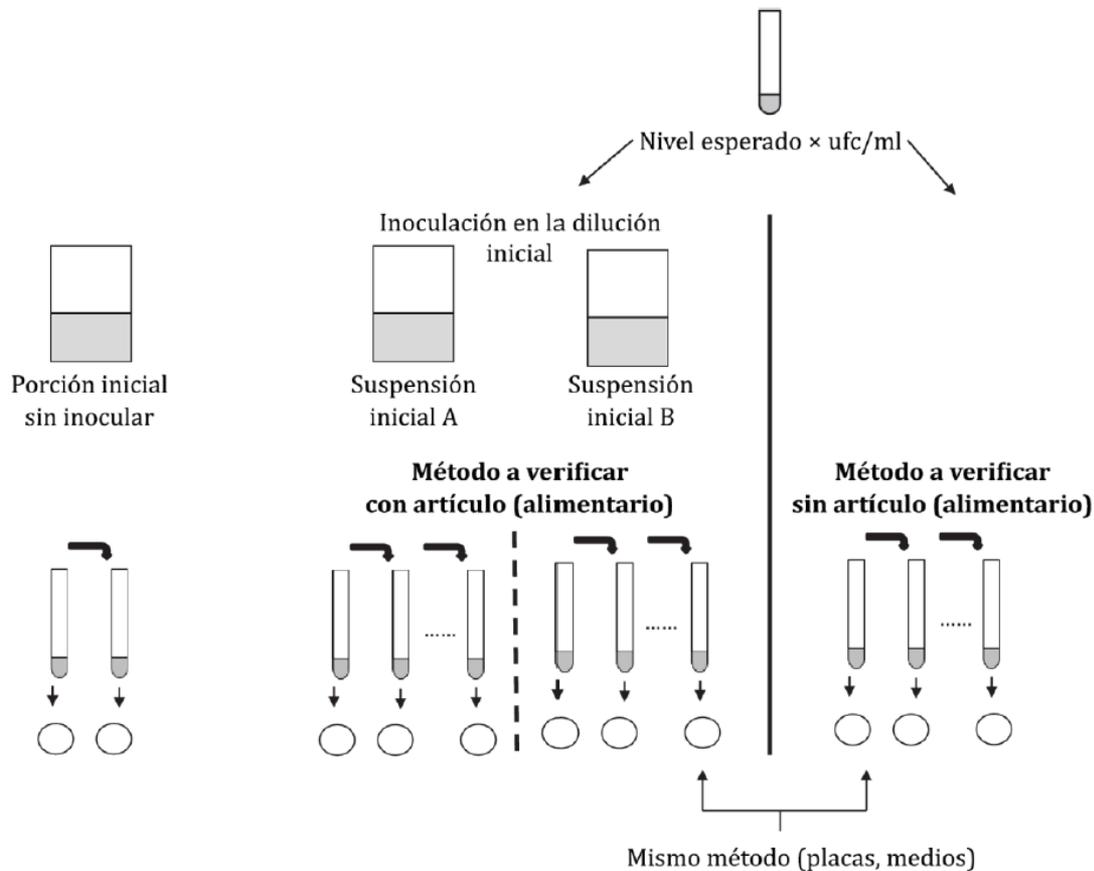
2.- VERIFICACIÓN DEL ARTÍCULO

Determinación de la desviación estándar (eBias).

Diseño experimental:

- Seleccionar las matrices. Analizar al menos un artículo, preferiblemente difícil, de cada categoría.
- Contaminar artificialmente a tres niveles de inoculación que cubran el rango de uso del método por parte del laboratorio, en la suspensión inicial de cada muestra de ensayo.
- Cada nivel se realiza por duplicado. Se utiliza preferiblemente una muestra de laboratorio diferente o un lote diferente para cada uno de los tres niveles de inoculación.
- Realizar el recuento del artículo contaminado y la suspensión del inóculo (cultivo puro) utilizada para su inoculación.
- Analizar la porción para análisis sin inocular para cada muestra de laboratorio o lote, para determinar el nivel de contaminación de base.

Ejemplo para la determinación de la desviación estándar (eBias) de un artículo a un nivel.





DISEÑO EXPERIMENTAL PARA VERIFICAR MÉTODO CUANTITATIVO:

2.- VERIFICACIÓN DEL ARTÍCULO

Evaluación de resultados.

Se comparan los resultados del artículo contaminado artificialmente con los resultados de la suspensión de inóculo utilizada para contaminar la suspensión inicial del artículo. El artículo y la suspensión se analizan usando el método a verificar.

Los resultados aplicables al artículo deben expresarse en \log_{10} ufc/porción para análisis y los aplicables a la suspensión de inóculo, en \log_{10} ufc/ml.

Límite de aceptabilidad.

En cada nivel, la diferencia absoluta entre los resultados del artículo y los de la suspensión del inóculo se espera que sea $\leq 0,5 \log_{10}$.

Sin embargo, si el artículo utilizado estaba contaminado naturalmente antes de la inoculación se debe tener en cuenta.

Criterio aceptabilidad, la diferencia absoluta entre los resultados del artículo y los de la suspensión del inóculo se espera que sea $\leq 0,5 \log_{10}$.

Tabla 13 - Resultados del ensayo obtenidos con el método a verificar

| | Resultado medio Artículo (alimentario) contaminado artificialmente (\log_{10} ufc/g o ml) ^a | Para comparación | | eBias: diferencia absoluta entre resultados de artículo (alimentario) contaminado artificialmente en cada porción para análisis y la suspensión de inóculo |
|---|---|--|---|--|
| | | Resultado Artículo (alimentario) contaminado artificialmente (\log_{10} cfu/porción para análisis) ^a | Resultado Suspensión de inóculo [sin artículo (alimentario)] artículo (\log_{10} cfu/ml) | |
| Muestra de laboratorio 1 (de lote 1), porción para análisis 1 | 2,06 (promedio de 1,87 y 2,25) | 3,06 | 3,17 | |
| Muestra de laboratorio 1 (de lote 1), porción para análisis 2 | | | | |
| Muestra de laboratorio 2 (de lote 2), porción para análisis 1 | 3,11 (promedio de 3,16 y 3,06) | 4,11 | 4,05 | |
| Muestra de laboratorio 2 (de lote 2), porción para análisis 2 | | | | |
| Muestra de laboratorio 3 (de lote 3), porción para análisis 1 | 3,99 (promedio de 3,93 y 4,04) | 4,99 | 5,29 | |
| Muestra de laboratorio 3 (de lote 3), porción para análisis 2 | | | | |

a Este ejemplo se basa en el uso de una porción para análisis de 10 g inoculada con 1 ml de inóculo.

Todos cumplen con los criterios


Tabla 16 - Límites de aceptabilidad aplicables a la verificación de métodos validados

| Método | Características de rendimiento | Límites de aceptabilidad |
|-----------------------|--------------------------------|--|
| Cualitativo | eLOD ₅₀ | Para los protocolos 1 y 2: eLOD ₅₀ ≤ 4 × LOD ₅₀ Para el protocolo 3: ≥ 6 de 7 resultados positivos |
| Cuantitativo | S _{IR} | S _{IR} ≤ 2 × valor medio más bajo de S _R ^a determinado durante el estudio de validación |
| | eBias | log ₁₀ ufc/ml (inóculo) - promedio log ₁₀ ufc/porción para análisis (artículo [alimentario] contaminado artificialmente) ≤ 0,5 log ₁₀ para cada uno de los niveles de inoculación |
| Confirmación o tipaje | Inclusividad y exclusividad | Concordancia del 100% entre métodos |

a S_{IR} ≤ 2 × S_R para estudios de validación con un solo valor de S_R.



Métodos ya acreditados en el ámbito de aplicación de laboratorio:

no es necesario volver a verificar, a menos que se realicen cambios en el método.

Métodos o categorías (alimentarias) nuevas en el ámbito de aplicación de laboratorio:

verificar los métodos introducidos en el laboratorio tras la publicación de la norma ISO 16140-3.

verificar nuevas adiciones de categoría (alimentaria) a los métodos acreditados en el ámbito de aplicación de laboratorio.

Métodos revisados después de haber sido acreditados en el ámbito de aplicación de laboratorio:

Depende de si el cambio es mayor o menor, según lo determinado por el organismo de certificación.



PERIODO DE TRANSICIÓN

- **Hasta 31-12-2027** los laboratorios podrán realizar la verificación del método de los métodos de referencia no validados de acuerdo al Anexo F de la Norma ISO 16140-3.
- **A partir de 01-01-2028**, solo los métodos de referencia validados son aplicables para la verificación del método según la Norma ISO 16140-3.



Gracias ¿PREGUNTAS?

