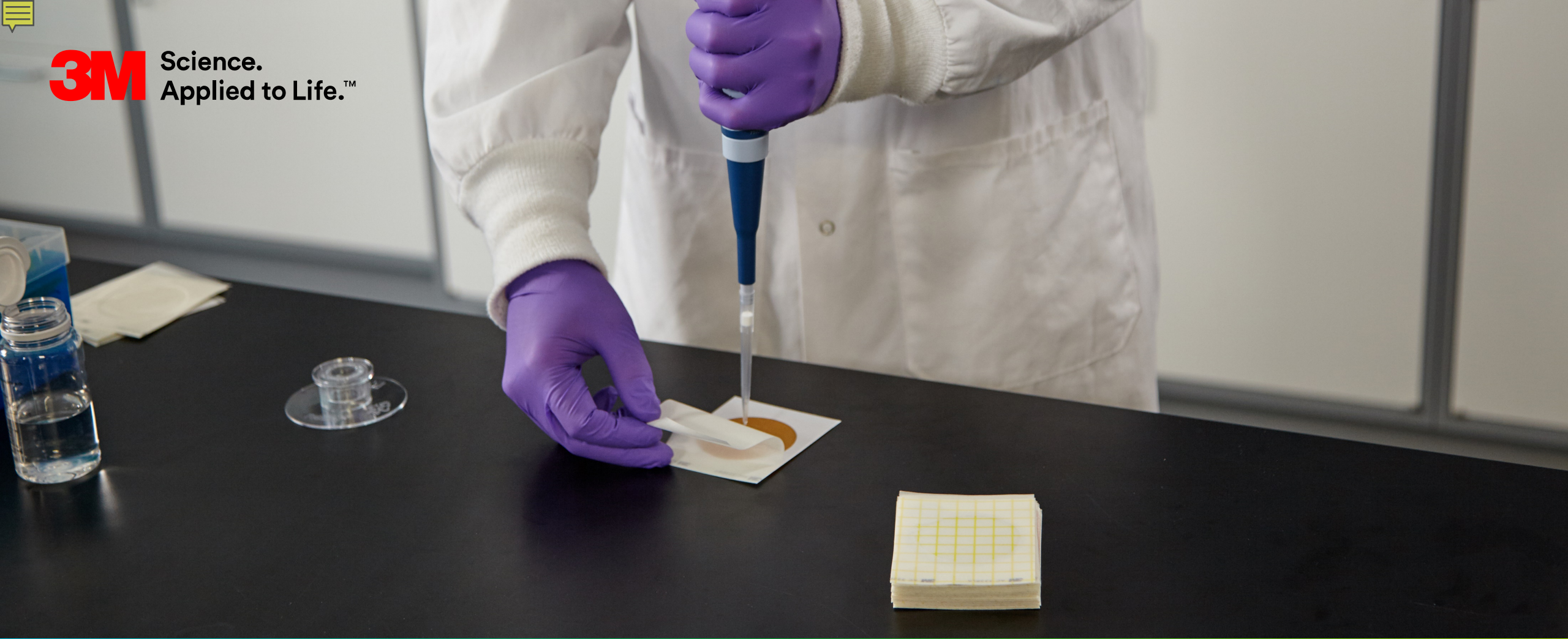




3M Science.
Applied to Life.™



3M Food Safety

Aplicación en tu laboratorio del Estándar ISO 16140-3:2021

Métodos actualmente dentro del alcance de la acreditación

Métodos *ya acreditados* dentro del alcance de la aplicación del Laboratorio:

- *No necesitan re-verificarse, a menos que haya cambios en el método*

Métodos o categorías (alimentos) *nuevos* al alcance de la aplicación del Laboratorio :

- *Verificar los métodos agregados luego de la publicación de la ISO 16140-3*
- *Verificar la adición de nuevas categorías (alimentos) a los métodos acreditados*

Los métodos *revisados* luego de ser acreditados por el laboratorio:

- *Depende- Cambios mayores o menos, determinados por el cuerpo acreditador*

Recuerde:

Los estándares de ISO son documentos voluntarios

ISO desarrolla el estándar pero no tiene *autoridad* sobre su implementación

Diferencias entre Validación y Verificación

De ISO 16140-1:2016 e ISO 16140-3:2021

2.81 Validación

Es el establecimiento de las características de desempeño de un método y aporte de **evidencia objetiva que los requisitos de desempeño para un uso especificado intencionado se cumplen**

Establishment of the performance characteristics of a method and provision of objective **evidence that the performance requirements for a specified intended use are fulfilled.**

2.83 Verificación

Demostración del desempeño de un método validado, en las manos del usuario, de acuerdo a las especificaciones del método determinadas en el estudio de validación y que se ajusta al fin intencionado

Demonstration that a validated method performs, in the user's hands, according to the method's specifications determined in the validation study and is fit for its intended purpose.



Validación VS Verificación

El avión “funciona” = *Validado* para usar

¿Usted volaría con alguien que no sabe cómo usarlo adecuadamente? = Uso adecuado es *verificado*

Alcance del método vs. validación vs. Aplicación del laboratorio

Método

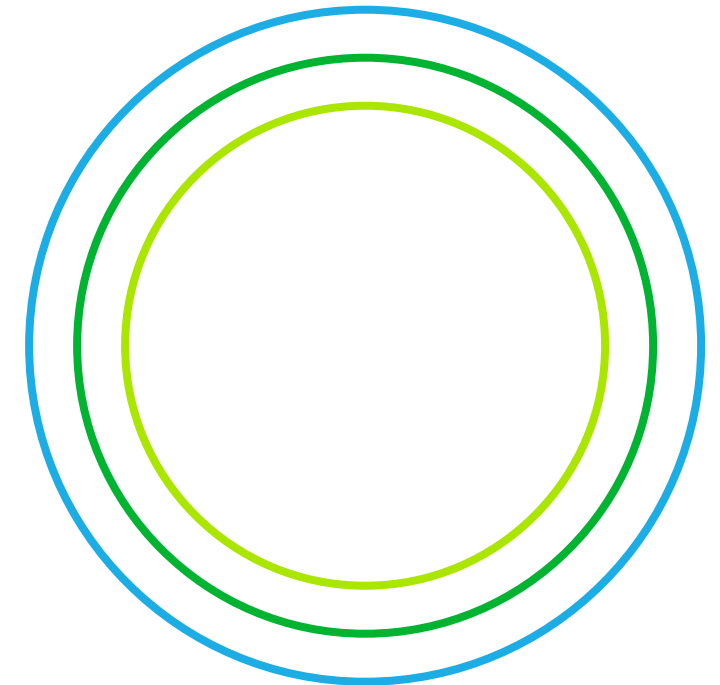
Especifica el producto o productos (categorías o tipos de producto) para los cuales se **afirma sea aplicable**

Validación

Especifica el producto o grupo de productos (Categorías o tipos de producto) para los cuales el método **se afirma sea validado**

Laboratorio

Especifica el producto o grupo de productos (Categorías o tipos de productos) para los cuales el método **se afirma ser usado por el laboratorio** y está dentro del alcance de la validación



Categorías de alimentos— ISO y AOAC INTERNATIONAL

Clasificación de categorías (alimentos): ISO 16140-2:2016 y ISO 16140-3:2021

Table A1: Classification of categories and suggested target combinations for verification studies

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 & 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 & confectionary	Multi-component foods or meal components	Pet food and animal feed	Environmental samples (food or feed production)	Primary production samples (PPS)

Food categories

Non-food categories



Verificación: dos etapas

Implementación de la verificación

Demuestra que el laboratorio usuario puede **ejecutar el método correctamente**

- *Un producto (alimento)*

Verificación de producto (alimento)

Demuestra que el laboratorio usuario puede **ejecutar el método con producto (alimento) pretendidos por el laboratorio usuario**

- *Productos (alimentos) analizados en tu laboratorio*



Alcance: Rango limitado de alimentos

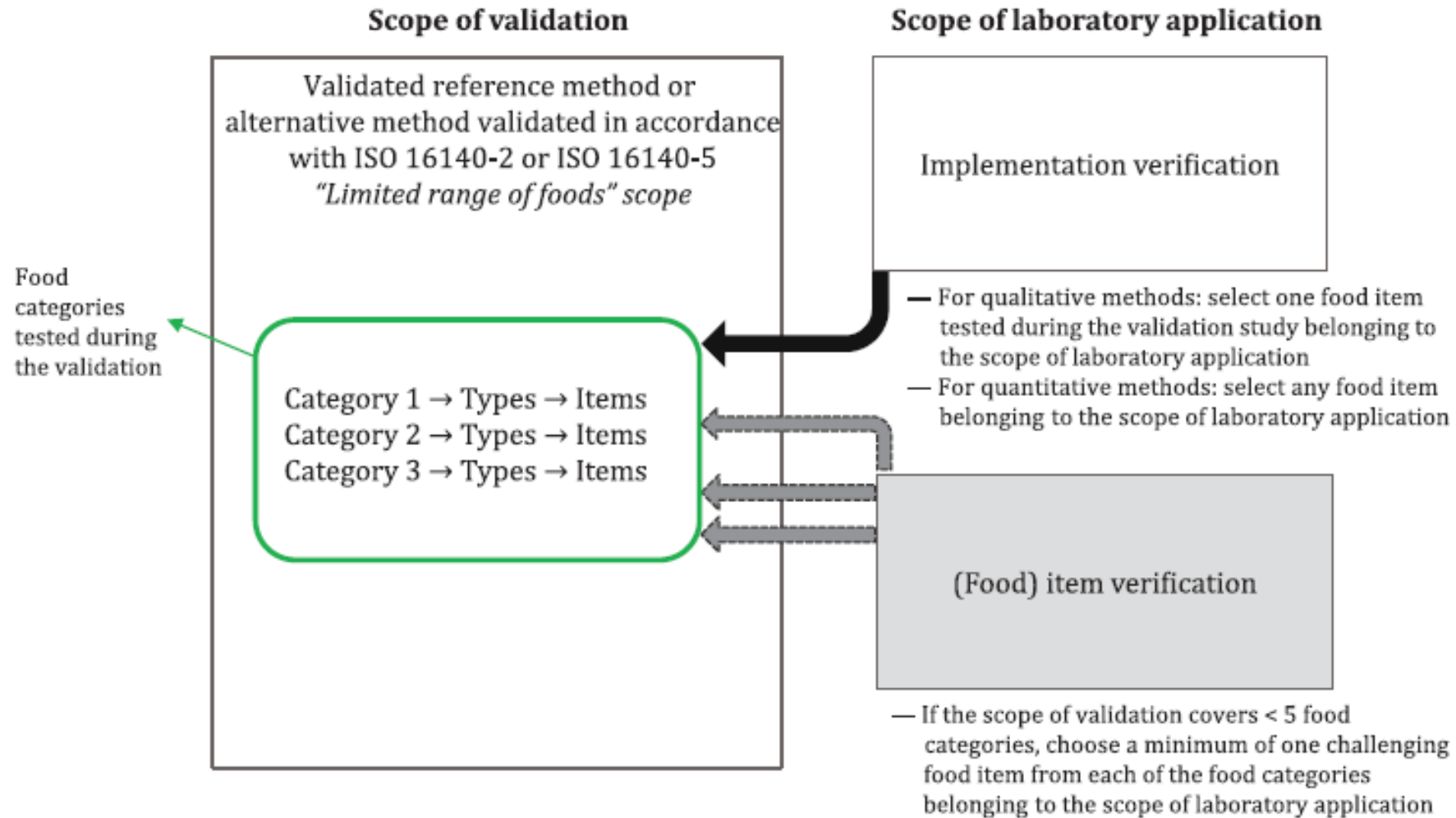


Figure 5 — Food items required when verifying a method for a “limited range of foods” scope

Alcance: Amplio rango de alimentos y otras categorías

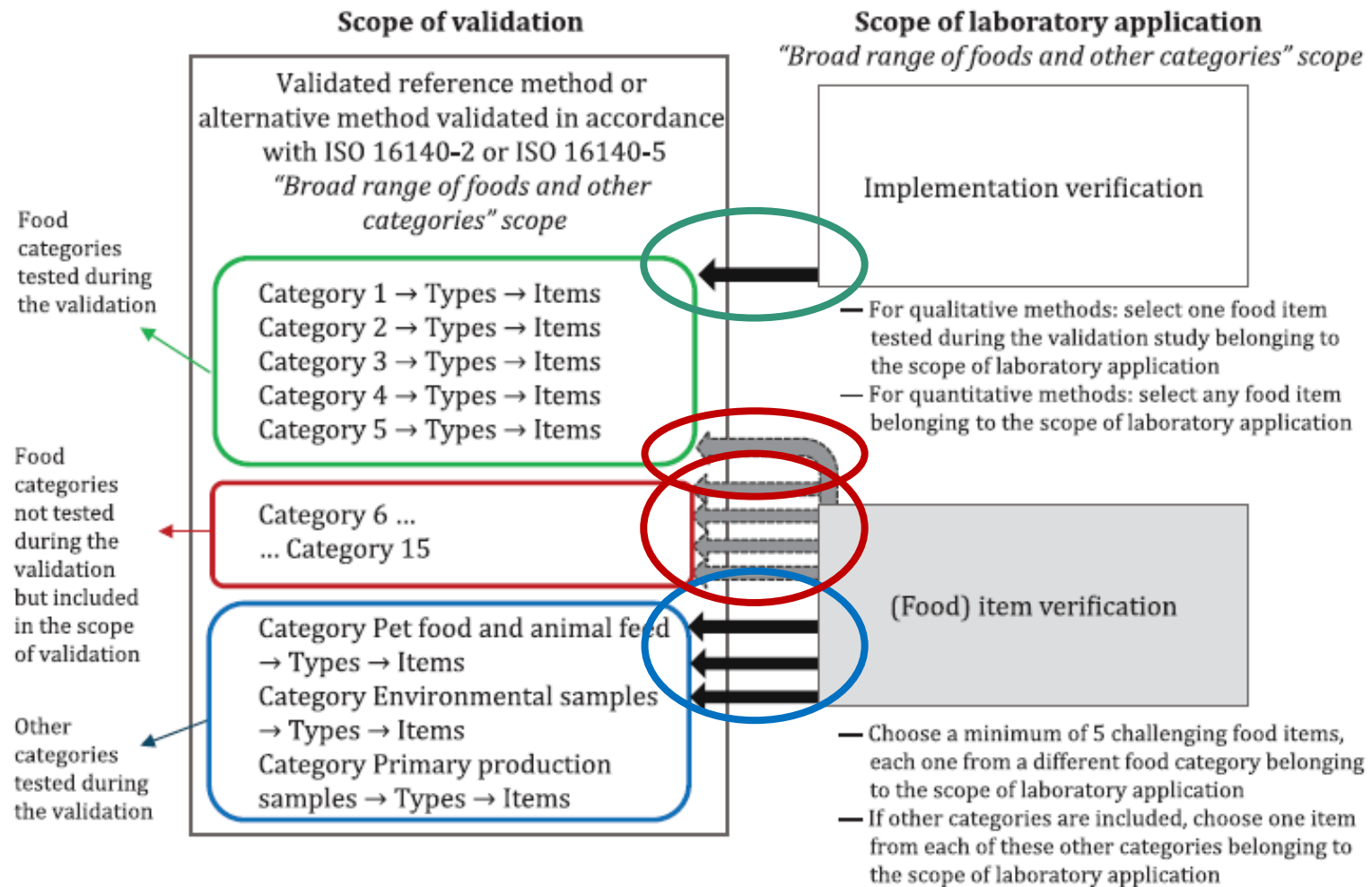


Figure 6 — Items required when verifying a method for a “broad range of foods and other categories” scope

ISO 16140-3 dirigido a métodos “completamente validados”

Método “completamente validado”

- Estudio comparativo: comparado con el método de referencia
- Estudio inter-laboratorio: Usando el mismo producto (alimento) en varios laboratorios

Estudio Interlaboratorio (Interlaboratory study-ILS)

- ISO 16140-2:2016 (vía: MicroVal, Certificación AFNOR, NMKL NordVal INTERNATIONAL)
- AOAC INTERNATIONAL
 - ~~AOAC® *Performance Tested Methods*SM~~
 - AOAC® *Official Methods of Analysis*SM

Validación de método: ISO 16140-2 y AOAC OMA

ISO 16140-2:2016

Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method

TABLE A1: Classification of (food) categories & suggested target combinations for verification studies

Raw milk and dairy products	Heat-processed milk & 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 & egg products (derivatives)	Raw and ready-to-cook fish & 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 & confectionary	Multi-component foods or meal components	Pet food and animal feed	Environmental samples (food or feed production)	Primary production samples (PPS)

AOAC INTERNATIONAL

TECHNICAL BULLETIN: TB 02 MAY 2016:

Acceptable Validation Claims for Proprietary /Commercial Microbiology Methods for Foods & Environmental Surfaces

Acceptable Multiple Matrix Claims

Claim	Number of Matrices	Number of Categories/Groups ¹
Broad Range of Foods	15 (3 foods/categories)	5
Variety of Foods	≥ 10	5
Selected Foods	≥ 5	2
Food Category/Group	≥ 5	1
Environmental Surfaces	7	NA
Selected Surfaces	2–6	NA

Acceptable Environmental Surfaces

Air Filter Material	Cast Iron Coated to prevent rusting	Sealed Concrete	Plastic Polyethylene, Polypropylene, Polycarbonate
Rubber	Ceramic Glazed earthen material or glass	Stainless Steel	

Acceptable food categories sources for these claims are:

Foods Categories Table and information in *ISO 16140, Annex A*



Feldsine et al.: *Journal of AOAC INTERNATIONAL Vol. 85, No. 5, 2002, pp. 1187–1200*



Ejemplo de una verificación del 3M™ Ensayo de Detección Molecular 2 — *Salmonella* de acuerdo a ISO 16140-3

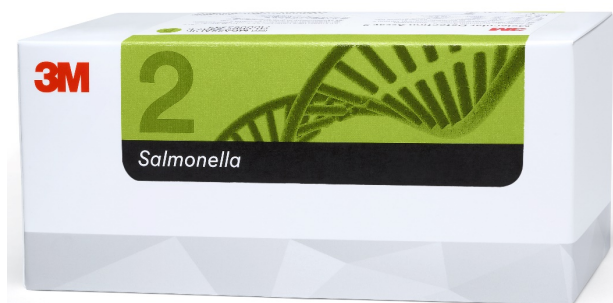
Conociendo nuestro Laboratorio “usuario”

El Laboratorio usuario

Categoría por ISO 16140-3 Tabla A1	Ubicación 1 Crudos	Ubicación 2 Congelados	Ubicación 3 Listos para cocinar
<p>Aves crudas & productos de aves listos para cocinar</p> 	<p>Molida de pollo Pechuga</p>	<p>Boneless sin piel Pechuga, muslos, tiras</p>	<p>Alitas Saborizadas 1, Saborizadas 2, Saborizadas 3</p>
	<p>Molida de pavo 85% magro, 93% magro</p>	<p>Pechuga de pollo fileteado Delgado Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3</p>	<p>Tiras de pollo Empanizada, Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3</p>
	<p>Boneless sin piel Pechuga de pollo, puntas, muslos, Piernas</p>	<p>Piezas de pechuga Fajita, ajo con hierbas, Barbacoa, Pimienta limon</p>	<p>Nuggets Empanizados, Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3</p>
	<p>Hueso/Piel Pechuga de pollo, puntas, Alas, piernas</p>		<p>Tiritas de pollo Empanizada, Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3</p>
<p>Muestras ambientales (Producción del alimento y de la comida del ave)</p>			<p>Esponjas del equipo (EM) con caldo Lethen</p>

Objetivo del Laboratorio usuario

Implementar el Sistema de Detección Molecular 3M™ y el 3M™ Ensayo de Detección Molecular 2 - *Salmonella* para la detección de *Salmonella* en una variedad de productos alimenticios y muestras ambientales dentro del alcance del Laboratorio



Proceso de verificación

¿El 3M Ensayo de Detección Molecular 2- *Salmonella* es un método completamente validado?

Efectivamente, lo es

NF VALIDATION por
Certificación AFNOR

- ✓ Estudio comparativo
- ✓ Estudio interlaboratorio

Certificate
Validation of alternative analysis methods
NF 102 - Application to the food industry
Certificate No. **3M 01/16-11/16**
Renewal decision dated: 02-16-2020
Expiry date: 25-11-2024

The alternative analysis method:
3M™ Molecular Detection Assay 2 - Salmonella
Validated for the detection of *Salmonella* spp.

Manufactured by:
3M Columbia Plant
9400 Park Road
COLUMBIA
65201 MISSOURI, USA

Has been certified according to the reference documents and the application scope specified here after:

Validation protocol	NF EN ISO 18146-2 (September 2016): Microbiology of the food chain. Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
Reference method(s)	NF EN ISO 6579-1 (April 2017) and its amendment A1 (March 2020): Microbiology of the food chain. Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of <i>Salmonella</i> spp. - Part 1: detection of <i>Salmonella</i> spp.
Scope	All human food products (by performing validation assays on a broad range of foods), pet food, animal feed products, and primary and industrial production environmental samples.
Restriction(s)	None.
Warning	None.
Other information	The scope includes the use of the 3M™ Molecular Detection instrument with its software version 2.2 or later versions.

Please send any queries concerning the performances of the certified alternative method to AFNOR Certification.

You may download the validation study summarized report on <https://nf-validation.afnor.org/en>.

11 rue Francis de Pressensac - 33071 La Plaine Ste Genevieve Cedex - France - T: +33 (0) 41 02 90 30 - F: +33 (0) 41 77 90 30
SAS au capital de 19 167 000 € - APE 879 00 RCS Belfort - www.afnor.org

afnor
CERTIFICATION

AOAC® Official Method of
AnalysisSM 2016.01

Final Action 2019

- ✓ Estudio comparativo
- ✓ Estudio Interlaboratorio

AOAC Official Method 2016.01
Salmonella spp. in Select Foods and Environmental Surfaces
3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2-Salmonella Method
Final Action 2019

[Applicable to detection of *Salmonella* spp. in raw ground beef (77% lean), raw ground chicken, chicken carcass rinse, chicken carcass sponge, pasteurized liquid whole egg, cooked breaded chicken, instant nonfat dry milk, black pepper, cocoa powder, raw whole shrimp, raw bagged spinach, creamy peanut butter, dry dog food, pasteurized processed American cheese, spent spent irrigation water, and sealed concrete, stainless steel, and sealed ceramic tile environmental surfaces.]

Caution: The 3M MDA 2-Salmonella is intended for use in a laboratory environment by professionals trained in laboratory techniques. 3M has not documented the use of this product in industries other than the food and beverage industries. For example, 3M has not documented this product for testing drinking water, pharmaceutical, cosmetics, clinical, or veterinary samples. The 3M MDA 2-Salmonella has not been evaluated with all possible food products, food processes, testing protocols, or with all possible strains of bacteria.

As with all test methods, the source of enrichment medium can influence the results. The 3M MDA 2-Salmonella has only been evaluated for use with the enrichment media specified in the manufacturer's instructions for use.

The 3M MDS instrument is intended for use with samples that have undergone heat treatment during the assay lysis step, which is designed to destroy organisms present in the sample. Samples that have not been properly heat-treated during the assay lysis step may be considered a potential biohazard and should not be inserted into the 3M MDS instrument.

The user should read, understand, and follow all safety information in the instructions for the 3M MDS and the 3M MDA 2-Salmonella. Retain the safety instructions for future reference.

Periodically decontaminate laboratory benches and equipment (pipets, capillary tubes, etc.) with a 1:5% (v/v in water) household bleach solution or DNA removal solution. When testing is complete, follow current industry standards for the disposal of contaminated waste. Consult the Material Safety Data Sheet for additional information and local regulations for disposal.

To reduce the risks associated with exposure to chemicals and biohazards, (1) perform pathogen testing in a properly equipped laboratory under the control of trained personnel; (2) always follow standard laboratory safety practices, including wearing appropriate protective apparel and eye protection while handling reagents and contaminated samples; (3) avoid contact with the contents of the enrichment media and reagent tubes after amplification; and (4) dispose of enriched samples according to current industry standards.

To reduce the risks associated with environmental contamination, follow current industry standards for disposal of contaminated waste.

See Tables 2016.01A and 2016.01B for a summary of results of the interlaboratory study supporting acceptance of the method.

A. Principle
The 3M MDA 2-Salmonella method is used with the 3M MDS for the rapid and specific detection of *Salmonella* in enriched food, feed, and food-process environmental samples. The 3M MDA 2-Salmonella uses loop-mediated isothermal amplification of unique DNA target sequences with high specificity and sensitivity, combined with bioluminescence to detect the amplification. Presumptive positive results are reported in real time, whereas negative results are displayed after the assay is completed. Samples are pre-enchanted in ISO BPW.

B. Apparatus and Reagents
Items (b) (g) are available as the 3M MDA 2-Salmonella kit from 3M Food Safety (St. Paul, MN, USA).
(a) 3M MDS—MDS100 (3M Food Safety).
(b) 3M MDA 2-Salmonella reagent tubes.—Twelve strips of eight tubes.
(c) Lysis solution (LS) tubes.—Twelve strips of eight tubes.
(d) Extra caps.—Twelve strips of eight caps.
(e) Reagent control.—Eight reagent tubes.
(f) Quick Start Guide.
(g) 3M Molecular Detection speed loader tray.
(h) 3M Molecular Detection *chill block insert*—3M Food Safety.
(i) 3M Molecular Detection *heat block insert*—3M Food Safety.
(j) 3M Molecular Detection *cap/capcup tool for reagent tubes*—3M Food Safety.
(k) 3M Molecular Detection *cap/capcup tool for lysis tubes*—3M Food Safety.
(l) Empty lysis tube rack.—3M Food Safety.
(m) Empty reagent tube rack.—3M Food Safety.
(n) ISO BPW.—3M Food Safety. Formulation equivalent to ISO 6579-2002 Annex B or 3M equivalent.
(o) Disposable pipet.—Capable of 20 µL.
(p) Multichannel (eight-channel) pipet.—Capable of 20 µL.
(q) Sterile filter-sterilized pipet tips.—Capable of 20 µL.
(r) Filter/Sonicator™ bags.—Seward or equivalent.
(s) Sonicator.—Seward or equivalent.
(t) Thermometer.—Calibrated range to include 100 ± 1°C.
(u) Dry block heater unit.—Capable of maintaining 100 ± 1°C.
(v) Incubator.—Capable of maintaining 37 ± 1°C or 41 ± 1°C.
(w) Refrigerator.—Capable of maintaining 2-8°C, for storing the 3M MDA components.
(x) Computer.—Compatible with the 3M MDS instrument.
(y) 3M Environva™.—Hydrated with Letheen Broth (3M Food Safety, Banglore, Australia).
(z) 3M hydrated sponge stick with 10 mL D/E.—3M Food Safety.

C. General Instructions
(1) Store the 3M MDA 2-Salmonella at 2-8°C. Do not freeze. Keep kit away from light during storage. After opening the kit, check

© 2019 AOAC INTERNATIONAL



Proceso de verificación

- A Implementación de la verificación
- B Verificación de producto (Alimento)

Sección 4.1, 4.5

ISO 16140-3:2021

- 1 ¿El método esta validado? Lo está!
- 2 Selecciona productos (Alimentos) para A y B



Proceso de verificación

A Implementación de la verificación

Selecciona un producto (alimento) evaluado durante el estudio de validación que se encuentre dentro del alcance de aplicación del laboratorio del laboratorio usuario

B Verificación de producto (Alimento)

- 1 ¿El método esta validado? Lo está!
- 2 Selecciona productos (Alimentos) para A y B

Sección 4.2

ISO 16140-3:2021

3M™ Ensayo de Detección Molecular 2 — *Salmonella*

AOAC Official Method 2016.01

**AOAC Official Method 2016.01
Salmonella spp. in Select Foods
and Environmental Surfaces**

**3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2–*Salmonella* Method
First Action 2016
Final Action 2019**

[Applicable to detection of *Salmonella* spp. in raw ground beef (73% lean), raw ground chicken, chicken carcass rinse, chicken carcass sponge, pasteurized liquid whole egg, cooked breaded chicken, instant nonfat dry milk, black pepper, cocoa powder, raw whole shrimp, raw bagged spinach, creamy peanut butter, dry dog food, pasteurized processed American cheese, spent sprout irrigation water, and sealed concrete, stainless steel, and sealed ceramic tile environmental surfaces.]

3M™ Ensayo de Detección Molecular 2 — *Salmonella*

Certificado AFNOR 3M01/16-11/16


Alcance

Todos los productos alimenticios y muestras ambientales de producción

Category	Type	Positive	Negative	Total
1	a Ready to eat foods	9	11	20
	b Ready to reheat foods	12	10	22
	c Cured and smoked products	9	11	20
	Total	30	32	62
2	a Raw meat products	13	10	23
	b Raw poultry	11	9	20
	c Raw delicatessen	9	12	21
	Total	33	31	64
3	a Pasteurized products	11	9	20
	b Raw products	9	11	20
	c Ingredients and low moisture products	30	30	60
	Total	50	50	100
4	a Raw fish and seafood	15	9	24
	b Raw sprouts and produce	11	10	21
	c Raw fruits and vegetables	9	12	21
	Total	35	31	66
5	a Cocoa powders and cocoa based products	32	32	64
	b Pasteurized eggs and egg powders	12	10	22
	c Spices, aromatic herbs, concentrates, teas, coffees, culinary preparation	30	34	64
	Total	74	76	150
6	a Ground beef meat	13	12	25
	b Beef trim	10	11	21
	c Raw veal, lamb, poultry meats	11	10	21
	Total	34	33	67
6	a Ground beef meat	13	12	25
	b Beef trim	10	11	21
	c Raw veal, lamb, poultry meats	11	10	21
	Total	34	33	67
7	a Dusts and residues	10	10	20
	b Cleaning and process waters	10	10	20
	c Surface samples	10	10	20
	Total	30	30	60
8	a Pet food	12	4	16
	b Animal feed	10	15	25
	c Raw material	11	17	28
	Total	33	36	69
9	a Animal feces	33	59	92
	b Environmental samples and non-feces	11	31	42
	Total	44	90	134



Seleccionando Producto (Alimento) para la implementación de la verificación

El Laboratorio usuario			
Categoría por ISO 16140-3 Tabla A1	Ubicación 1 Crudos	Ubicación 2 Congelados	Ubicación 3 Listos para cocinar
Aves crudas & productos de aves listos para cocinar 	Molida de pollo Pechuga	Boneless sin piel Pechuga, muslos, tiras	Alitas Saborizadas 1, Saborizadas 2, Saborizadas 3
	Molida de pavo 85% magro, 93% magro	Pechuga de pollo fileteado Delgado Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3	Tiras de pollo Empanizada, Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3
	Boneless sin piel Pechuga de pollo, puntas, muslos, Piernas	Piezas de pechuga Fajita, ajo con hierbas, Barbacoa, Pimienta limon	Nuggets Empanizados, Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3
	Hueso/Piel Pechuga de pollo, puntas, Alas, piernas		Tiritas de pollo Empanizada, Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3
Muestras ambientales (Producción del alimento y de la comida del ave)			Esponjas del equipo (EM) con caldo Letheen

AOAC Official Method 2016.01
Salmonella spp. in Select Foods and Environmental Surfaces
3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2–Salmonella Method
First Action 2016
Final Action 2019

[Applicable to detection of *Salmonella* spp. in raw ground beef (73% lean), raw ground chicken, chicken carcass rinse, chicken carcass sponge, pasteurized liquid whole egg, cooked breaded chicken, instant nonfat dry milk, black pepper, cocoa powder, raw whole shrimp, raw bagged spinach, creamy peanut butter, dry dog food, pasteurized processed American cheese, spent sprout irrigation water, and sealed concrete, stainless steel, and sealed ceramic tile environmental surfaces.]

Alimentos evaluados durante
el estudio de validación
(AOAC OMA 2016.1)

Sección 4.2

ISO 16140-3:2021


Implementación de la verificación

Selecciona un producto (alimento) evaluado durante el estudio de validación que se encuentre dentro del alcance de aplicación del laboratorio del laboratorio usuario



 AOAC® OMA 2016.01

Seleccionando Producto (Alimento) para la implementación de la verificación

El Laboratorio usuario			
Categoría por ISO 16140-3 Tabla A1	Ubicación 1 Crudos	Ubicación 2 Congelados	Ubicación 3 Listos para cocinar
Aves crudas & productos de aves listos para cocinar 	Molida de pollo Pechuga	Boneless sin piel Pechuga, muslos, tiras	Alitas Saborizadas 1, Saborizadas 2, Saborizadas 3
	Molida de pavo 85% magro, 93% magro	Pechuga de pollo fileteado Delgado Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3	Tiras de pollo Empanizada, Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3
	Boneless sin piel Pechuga de pollo, puntas, muslos, Piernas	Piezas de pechuga Fajita, ajo con hierbas, Barbacoa, Pimienta limon	Nuggets Empanizados, Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3
	Hueso/Piel Pechuga de pollo, puntas, Alas, piernas		Tiritas de pollo Empanizada, Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3
Muestras ambientales (Producción del alimento y de la comida del ave)			Esponjas del equipo (EM) con caldo Letheen

AOAC Official Method 2016.01
Salmonella spp. in Select Foods and Environmental Surfaces
3M™ Molecular Detection Assay (MDA) 2–Salmonella Method
First Action 2016
Final Action 2019

[Applicable to detection of *Salmonella* spp. in raw ground beef (73% lean), raw ground chicken, chicken carcass rinse, chicken carcass sponge, pasteurized liquid whole egg, cooked breaded chicken, instant nonfat dry milk, black pepper, cocoa powder, raw whole shrimp, raw bagged spinach, creamy peanut butter, dry dog food, pasteurized processed American cheese, spent sprout irrigation water, and sealed concrete, stainless steel, and sealed ceramic tile environmental surfaces.]

Alimentos evaluados durante el estudio de validación (AOAC OMA 2016.1)

Si ninguno de los alimentos se encuentra en el alcance de la aplicación del laboratorio, el laboratorio usuario necesita obtener uno de los alimentos evaluados en la validación

Sección 4.2
ISO 16140-3:2021

Implementación de la verificación

Selecciona un producto (alimento) evaluado durante el estudio de validación que se encuentre dentro del alcance de aplicación del laboratorio del laboratorio usuario





Proceso de verificación

A Implementación de la verificación

B Verificación de producto (Alimento)

Selecciona un producto (alimento) evaluado durante el estudio de validación que se encuentre dentro del alcance de aplicación del laboratorio del laboratorio usuario


1 ¿El método esta validado? Lo está!

2 Selecciona productos (Alimentos) para A y B

Sección 4.3

ISO 16140-3:2021

Seleccionando Producto (Alimento) para la implementación de la verificación

El Laboratorio usuario			
Categoría por ISO 16140-3 Tabla A1	Ubicación 1 Crudos	Ubicación 2 Congelados	Ubicación 3 Listos para cocinar
<p>★ Aves crudas & productos de aves listos para cocinar</p> 	Molida de pollo Pechuga	Boneless sin piel Pechuga, muslos, tiras	Alitas Saborizadas 1, Saborizadas 2, Saborizadas 3
	Molida de pavo 85% magro, 93% magro	Pechuga de pollo fileteado Delgado Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3	Tiras de pollo Empanizada, Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3
	Boneless sin piel Pechuga de pollo, puntas, muslos, Piernas	Piezas de pechuga Fajita, ajo con hierbas, Barbacoa, Pimienta limon	Nuggets Empanizados, Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3
	Hueso/Piel Pechuga de pollo, puntas, Alas, piernas		Tiritas de pollo Empanizada, Saborizada 1, Saborizada 2, Saborizada 3
<p>★ Muestras ambientales (Producción del alimento y de la comida del ave)</p>			Esponjas del equipo (EM) con caldo Letheen

Sección 4.3
& Anexo B
ISO 16140-3:2021

Matrices retadoras

Biota asociada

Características fisicoquímicas
(i.e. pH, Aw, color, viscosidad)

Composición
(i.e. altas grasas, polifenoles)

★ 1 Categoría

★ +1 'Otra categoría'



¿Tenemos la cantidad adecuada de productos (alimentos)?

Sección 4.4

Tabla 1

ISO 16140-3:2021

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	$(N_{\text{food}} + N_{\text{other}} + 1) \leq 8$ 4+1+1\leq8 ✓
Other categories (N_{other}) scope only	1	$N_{\text{other}} \leq 3$	$(N_{\text{other}} + 1) \leq 4$

Nuestro laboratorio usuario tiene

- 1 Categoría
- +1 ‘Otra categoría’

Tabla A1: Categorías

Leche cruda y productos lácteos	Leche procesada térmicamente y productos Lácteos	Carne cruda y productos listos para cocinar (except aves)	Cárnicos listos para comer o listos para calentar	Aves y productos de aves listos para cocinar	Productos de aves listos para comer o listos para calentar
Huevo y productos de huevo (derivados)	Peces y marinos crudos y listos para cocinar (no procesados)	Productos de la pesca listos para comer, listos para calentar	Hortofrutícolas frescos	Frutas y vegetales procesados	Cereales, frutas, nueces, semillas y vegetales secos
Formula infantil y cereales infantiles	Chocolate, productos de panificación y con y confitería	Alimentos de múltiples componentes o platillos multicomponentes	Alimento de mascotas y alimento para ganado	Muestras ambientales (De alimentos o producción de alimento de ganado)	Muestras de producción primaria (PPS-Por sus siglas en inglés)

Pechuga de pollo molida
También evaluado en AOAC OMA
2016.01

Espojas para Monitoreo ambiental

1. Molida de pavo 83% magra
 2. Alas de pollo crudas
 3. Pechuga al ajo y hierbas (congelada)
 4. Tiras de pollo (Saborizada 1)
- En el alcance de la aplicación del laboratorio



Proceso de verificación

Sección 5
ISO 16140-3:2021

A Implementación de verificación

Primero (Producto: Pechuga molida de pollo)

B Verificación de producto (Alimento)

- 1 ¿El método está validado? Lo está!
- 2 Selecciona productos (Alimentos) para A y B
- 3 Determinar el eLOD₅₀

Protocolos para determinar el eLOD₅₀

Sección 5.2 ISO 16140-3:2021

Tabla 3 — Protocolos para determinar el eLOD₅₀ y número de replicas necesarias por nivel de inoculación

Protocolo	Nivel de inoculación por porción					
	Nivel alto 9 × LOD ₅₀ / Porción	Nivel intermedio 3 × LOD ₅₀ / Porción	Nivel bajo 1 × LOD ₅₀ / Porción	3 CFU a 5 CFU / Porción	Blanco	Número total de replicas
1	1	4	4	—	1	10
2	—	—	—	—	1	9
3	—	—	—	7	1	8

Cultivo sin previo conocimiento de la concentración

Material de referencia con concentración conocida

Nota: la abreviatura de Unidades Formadoras de Colonia es CFU.

Requiere conocer el LOD₅₀ del método validado

No precisa conocer el LOD₅₀ del método validado

LOD₅₀ de métodos validados

Seccion 5.4.2 ISO 16140-3:2021

Table 2016.01B. Summary of results for the detection of *Salmonella* in creamy peanut butter (25 g)

3M MDA 2– <i>Salmonella</i> results*	Inoculation level		
	Uninoculated	Low	High
Candidate presumptive positive/total No. of samples analyzed	3/144	83/144	144/144
POD _{CP}	0.02 (0.01–0.06)	0.58 (0.49–0.66)	1.00 (0.97–1.00)
S _P	0.14 (0.12–0.16)	0.50 (0.45–0.52)	0.00 (0.00–0.16)
S _L	0.03 (0.00–0.08)	0.00 (0.00–0.16)	0.00 (0.00–0.16)
S _R	0.14 (0.13–0.17)	0.50 (0.45–0.52)	0.00 (0.00–0.22)
P _T	0.0976	0.7877	1.0000
Candidate confirmed positive/total No. of samples analyzed	2/144	82/144	144/144
POD _{CC}	0.01 (0.00–0.05)	0.57 (0.49–0.65)	1.00 (0.97–1.00)
S _P	0.11 (0.10–0.16)	0.51 (0.46–0.52)	0.00 (0.00–0.16)
S _L	0.04 (0.01–0.07)	0.00 (0.00–0.12)	0.00 (0.00–0.16)
S _R	0.12 (0.11–0.14)	0.51 (0.46–0.52)	0.00 (0.00–0.22)
P _T	0.0221	0.9709	1.0000
Candidate confirmed positive/total No. of samples analyzed	1/144	81/144	144/144
POD _C	0.01 (0.00–0.04)	0.56 (0.48–0.65)	1.00 (0.97–1.00)
S _P	0.08 (0.07–0.16)	0.51 (0.45–0.52)	0.00 (0.00–0.16)
S _L	0.00 (0.00–0.03)	0.00 (0.00–0.13)	0.00 (0.00–0.16)
S _R	0.08 (0.07–0.10)	0.51 (0.46–0.52)	0.00 (0.00–0.22)
P _T	0.4368	0.9393	1.0000
Positive reference samples/total No. of samples analyzed	0/144	73/144	144/144
POD _R	0.00 (0.00–0.03)	0.51 (0.42–0.59)	1.00 (0.97–1.00)
S _P	0.00 (0.00–0.16)	0.51 (0.46–0.52)	0.00 (0.00–0.16)
S _L	0.00 (0.00–0.16)	0.00 (0.00–0.14)	0.00 (0.00–0.16)
S _R	0.00 (0.00–0.22)	0.51 (0.46–0.52)	0.00 (0.00–0.22)
P _T	1.0000	0.8963	1.0000
dLPOD _C (candidate versus reference) ^b	0.01 (–0.02 to 0.04)	0.06 (–0.06 to 0.17)	0.00 (–0.03 to 0.03)
dLPOD _{CP} (candidate presumptive versus candidate confirmed) ^b	0.01 (–0.03 to 0.05)	0.01 (–0.11 to 0.13)	0.00 (–0.03 to 0.03)

* Results include 95% confidence intervals.

^b A confidence interval for dLPOD that does not contain the value 0 indicates a statistical significant difference between the two methods.

‘Si no está disponible para la categoría del alimento, el valor LOD50 se asume igual o menor a 1CFU/porción de prueba’

POD reportado en el AOAC OMA no es el mismo que el LOD₅₀

Table 2016.01B. Summary of results for the detection of *Salmonella* in creamy peanut butter (25 g)

3M MDA 2– <i>Salmonella</i> results*	Inoculation level		
	Uninoculated	Low	High
Candidate presumptive positive/total No. of samples analyzed	3/144	83/144	144/144
POD _{CP}	0.02 (0.01–0.06)	0.58 (0.49–0.66)	1.00 (0.97–1.00)
s _r	0.14 (0.12–0.16)	0.50 (0.45–0.52)	0.00 (0.00–0.16)
s _L	0.03 (0.00–0.08)	0.00 (0.00–0.16)	0.00 (0.00–0.16)
s _R	0.14 (0.13–0.17)	0.50 (0.45–0.52)	0.00 (0.00–0.22)
P _T	0.0976	0.7877	1.0000
Candidate confirmed positive/total No. of samples analyzed	2/144	82/144	144/144
POD _{CC}	0.01 (0.00–0.05)	0.57 (0.49–0.65)	1.00 (0.97–1.00)
s _r	0.11 (0.10–0.16)	0.51 (0.46–0.52)	0.00 (0.00–0.16)
s _L	0.04 (0.01–0.07)	0.00 (0.00–0.12)	0.00 (0.00–0.16)
s _R	0.12 (0.11–0.14)	0.51 (0.46–0.52)	0.00 (0.00–0.22)
P _T	0.0221	0.9709	1.0000
Candidate confirmed positive/total No. of samples analyzed	1/144	81/144	144/144
POD _C	0.01 (0.00–0.04)	0.56 (0.48–0.65)	1.00 (0.97–1.00)
s _r	0.08 (0.07–0.16)	0.51 (0.45–0.52)	0.00 (0.00–0.16)
s _L	0.00 (0.00–0.03)	0.00 (0.00–0.13)	0.00 (0.00–0.16)
s _R	0.08 (0.07–0.10)	0.51 (0.46–0.52)	0.00 (0.00–0.22)
P _T	0.4368	0.9393	1.0000
Positive reference samples/total No. of samples analyzed	0/144	73/144	144/144
POD _R	0.00 (0.00–0.03)	0.51 (0.42–0.59)	1.00 (0.97–1.00)
s _r	0.00 (0.00–0.16)	0.51 (0.46–0.52)	0.00 (0.00–0.16)
s _L	0.00 (0.00–0.16)	0.00 (0.00–0.14)	0.00 (0.00–0.16)
s _R	0.00 (0.00–0.22)	0.51 (0.46–0.52)	0.00 (0.00–0.22)
P _T	1.0000	0.8963	1.0000
dLPOD _C (candidate versus reference) ^a	0.01 (–0.02 to 0.04)	0.06 (–0.06 to 0.17)	0.00 (–0.03 to 0.03)
dLPOD _{CP} (candidate presumptive versus candidate confirmed) ^a	0.01 (–0.03 to 0.05)	0.01 (–0.11 to 0.13)	0.00 (–0.03 to 0.03)

* Values in bold are 95% confidence intervals.

^a A confidence interval for dLPOD that does not contain the value 0 indicates a statistical significant difference between the two methods.

Table 19 - LOD₅₀ results

Category	(Strain / matrix) pair	Level of detection at 50% (CFU / samples size) according to Wilrich & Wilrich) ¹	
		Reference method	Alternative method
1	Macedoine / <i>S. Mbandaka</i> Ad914	1,4 [0,7;2,7]	1,4 [0,7;2,7]
2	Ground beef (protocol 2) / <i>S. Typhimurium</i> A00C060	0,5 [0,3;0,9]	0,6 [0,4;1,1]
3	Raw milk / <i>S. Ohio</i> Ad1482	1,5 [0,8;2,6]	1,1 [0,6;1,9]
	Infant formula with probiotics / <i>S. Anatum</i> Ad298	0,4 [0,2;0,8]	0,2 [0,1;0,3]
4	Spinach / <i>S. Virchow</i> Ad1721	0,5 [0,3;0,9]	0,6 [0,4;1,0]
5	Cinnamon / <i>S. Agona</i> Ad1725	5,3 [3,1;9,0]	1,5 [0,8;2,8]
	Cocoa powder / <i>S. Typhimurium</i> Ad2034	4,2 [2,1;8,2]	4,2 [2,1;8,2]
6	Ground beef (protocol 6) / <i>S. Typhimurium</i> A00C060	0,6 [0,3;0,9]	0,6 [0,4;1,1]
7	Process water / <i>S. Livingstone</i> A00E058	0,4 [0,2;0,7]	0,8 (0,5;1,3)
8	Pellets for dog / <i>S. Derby</i> Ad1878	2,4 [1,4;3,9]	2,4 [1,4;3,9]
9	Poultry feces / <i>S. Enteritidis</i> Ad1411	2,1 [1,2;3,7]	4,4 [2,5;7,9]
10	Infant cereals (375g) / <i>S. Mbandaka</i> Ad1722	0,9 [0,6;1,6]	0,9 [0,6;1,6]
11	Infant formula with probiotics (375g) / <i>S. Agona</i> Ad1483	0,2 [0,1;0,3]	0,5 [0,3;1,1]
Combined		1,3 [1,1;1,6]	1,3 [1,1;5,4]

El POD reportado en AOAC OMA no es el mismo que el LOD₅₀

‘Si no está disponible para la categoría del alimento, el valor LOD50 se asume igual o menor a 1CFU/porción de prueba’



LOD₅₀ puede estar disponible en la NF VALIDATION

Sección 5.4.2
ISO 16140-3:2021

LOD₅₀ de un método validado

Tabla 3 — Protocolos para determinar el eLOD₅₀ y número de replicas necesarias por nivel de inoculación

Protocolo	Nivel de inoculación por porción					
	Nivel alto 9 × LOD ₅₀ / Porción	Nivel intermedio 3 × LOD ₅₀ / Porción	Nivel bajo 1 × LOD ₅₀ / Porción	3 CFU a 5 CFU / Porción	Blanco	Número total de replicas
1	1	4	4	—	1	10
2	—	—	—	—	1	9
3	—	—	—	7	1	8

Nota: la abreviatura de Unidades Formadoras de Colonia es CFU.

LOD₅₀ esta valor puede obtenerse del estudio de validación

9 x 1 CFU/
porción


3 x 1 CFU/
porción

1 x 1 CFU/
porción

blanco

Protocolos validados: Articulos (alimentos) de prueba para la verificación

3M™ Ensayo de Detección Molecular 2 — *Salmonella*

 Instrucciones
de producto

Specific Instructions for Validated Methods
AOAC® Official Methods of Analysis™ 2016.01
AOAC® Performance Tested™ Certificate #091501



In AOAC Research Institute OMA™ and PTM™ programs, the 3M Molecular Detection Assay 2 - *Salmonella* was found to be an effective method for the detection of *Salmonella*. The matrices tested in the study are shown in Table 3.

Table 3. Enrichment protocols according to AOAC OMA™ 2016.01 and AOAC PTM™ Certificate #091501. Volume of sample transferred to 3M Lysis Solution tubes is 20 µL.

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume	Enrichment Temperature (± 1°C)	Enrichment Time (hours)	
Raw ground beef	25 g	225 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	10-24	
	325 g	975 mL BPW ISO (pre-warmed)			
Raw ground chicken	25 g	225 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	10-24	
	325 g	975 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	14-24	
Cooked breaded chicken	325 g	2,925 mL BPW ISO	37	18-24	
Dry dog food	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	
	375 g	1,500 mL BPW ISO			
Black pepper, Raw whole shrimp, Raw bagged spinach, Pasteurized processed American cheese	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	
Chicken carcass rinse	30 mL	30 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-24	
Chicken carcass sponge	1 sponge	50 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-24	
Instant non-fat dry milk	25 g	225 mL BPW ISO	37	20-24	
Cocoa powder	25 g	225 mL BPW ISO	37	24-28	
Pasteurized liquid whole egg	100 mL	900 mL BPW ISO	37	18-24	
Spent sprout irrigation water	375 mL	3,375 mL BPW ISO	37	18-24	
Creamy peanut butter	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	
	375 g	3,375 mL BPW ISO			
Environmental	Sealed concrete	1 sponge	225 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-24
	Stainless steel	1 swab	10 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-24
	Sealed ceramic tile	1 sponge	50 mL BPW ISO (pre-warmed)	41.5	18-24

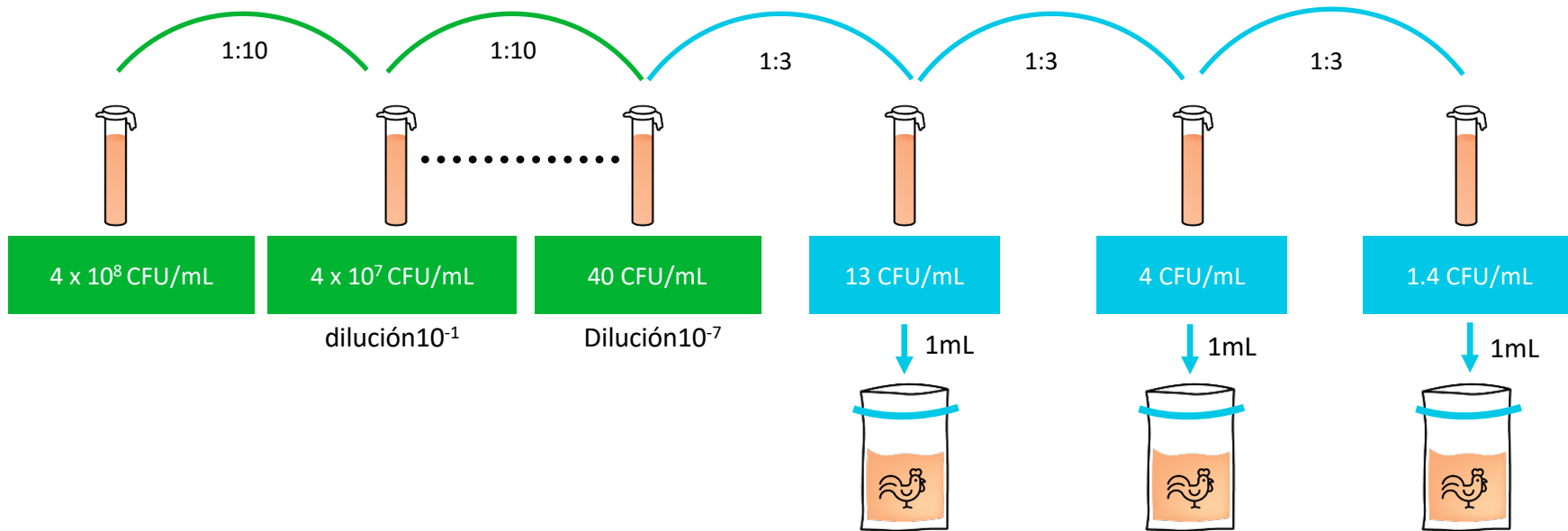
Protocolo de prueba
para carne de pollo
molida cruda
**Implementación de
la verificación**

Sample Matrix	Sample Size	Enrichment Broth Volume	Enrichment Temperature (± 1°C)	Enrichment Time (hours)	Secondary Enrichment Medium (mL)	Secondary Enrichment Temperature (±1°C)	Secondary Enrichment Time (hours)
Raw shrimp, head on	25 g	225 mL BPW ISO	37	18-24	R-V R10: 0.1 mL into 10 mL ^(a)	41.5	4-24

(a) Transfer 10 µL of enriched sample to Lysis Solution tubes. Refer to step 4.7 of Lysis section.




Inoculación de porciones para determinar eLOD₅₀



Sección 5.4.2
Tablas 4,5
Anexo C
ISO 16140-3

No se necesitan células estresadas!

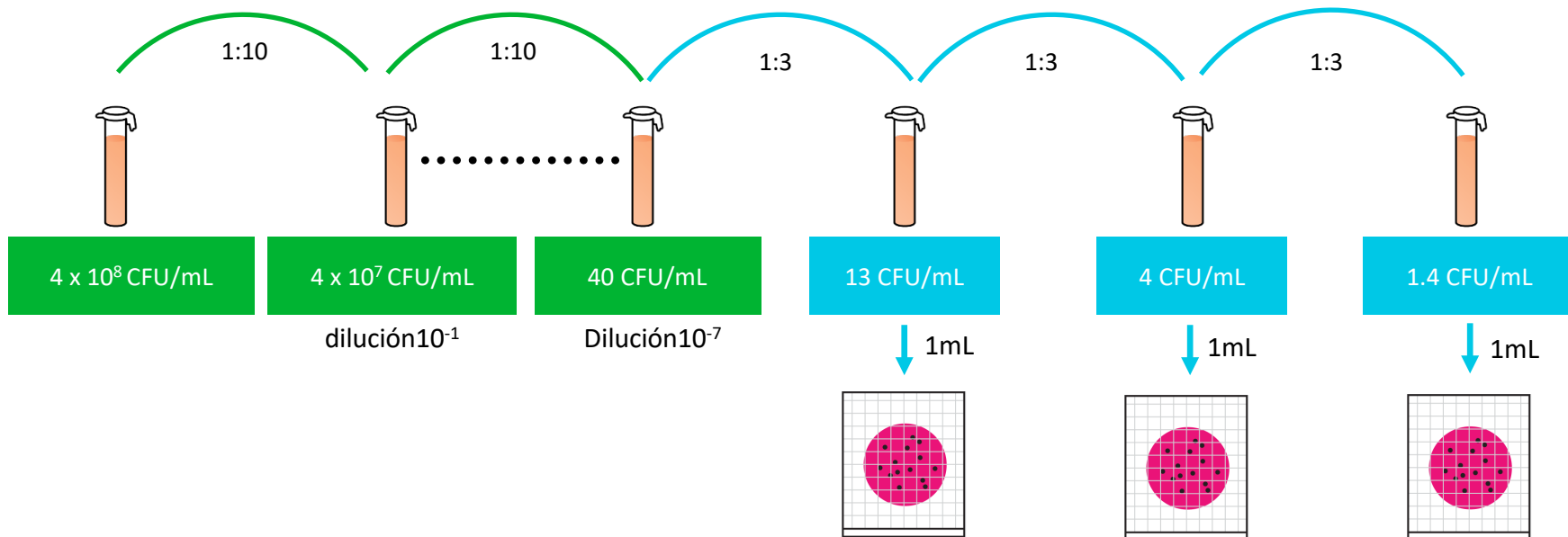
 25 g de carne de pechuga de pollo molida cruda

Protocolo	Nivel de inoculación por porción					
	Nivel alto 9 × LOD ₅₀ / Porción	Nivel intermedio 3 × LOD ₅₀ / Porción	Nivel bajo 1 × LOD ₅₀ / Porción	3 CFU a 5 CFU / Porción	Blanco	Número total de replicas
1	1 9 CFU	4 3 CFU	4 1 CFU	—	1	10
2	—	—	—	—	1	9
3	—	—	—	7	1	8

Note: The abbreviation of colony forming units is cfu.

Inoculación de porciones para determinar eLOD₅₀

Sección
5.4.2 y anexo
C
ISO 16140-3:2021



Protocolo	Nivel de inoculación por porción					
	Nivel alto 9 × LOD ₅₀ / Porción	Nivel intermedio 3 × LOD ₅₀ / Porción	Nivel bajo 1 × LOD ₅₀ / Porción	3 CFU a 5 CFU / Porción	Blanco	Número total de replicas
1	1 9 CFU	4 3 CFU	4 1 CFU	—	1	10
2	—	—	—	—	1	9
3	—	—	—	7	1	8

Note: The abbreviation of colony forming units is cfu.



Proceso de Verificación

Sección 5
ISO 16140-3:2021

A Implementación de la verificación → Primero (Producto: Pechuga molida de pollo)

B Verificación de Producto (alimento)

- 1 ¿El método esta validado? Lo está!
- 2 Seleccionar productos (Alimentos) para A y B
- 3 Determinar el eLOD₅₀
- 4 Ejecutar el estudio de verificación

Resultados: eLOD₅₀ para la implementación de la verificación

Sección 5.5
ISO 16140-3:2021

Nivel de Inoculación	Alto	Intermedio	Bajo	Blanco
Siguiendo protocolo 1 (Tabla 3 16140-3)	9 CFU/porción	3 CFU/porción	1 CFU/porción	9 CFU/porción
Número de muestras de de carne molida de pechuga de pollo crudo inoculadas (25 g)	1	4	4	1
Número de positivos confirmados con AOAC OMA 2016.01	1	4	2	0
Inóculo (CFU/mL)	13	4	1.4	*
			eLOD ₅₀	0.7 x LIL=0.98

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
1/1	4/4	1/4	0/1	= 1,0 × LIL

¿Esto es aceptable?



Resultados: eLOD₅₀ para la implementación de la verificación

Aprobamos!

Sección 5.6 & 8
Tabla 16
ISO 16140-3:2021

Nivel de Inoculación	Alto	Intermedio	Bajo	Blanco
Siguiendo protocolo 1 (Tabla 3 16140-3)	9 CFU/porción	3 CFU/porción	1 CFU/porción	9 CFU/porción
Número de muestras de de carne molida de pechuga de pollo crudo inoculadas (25 g)	1	4	4	1
Número de positivos confirmados con AOAC OMA 2016.01	1	4	2	0
Inóculo (CFU/mL)	13	4	1.4	*
			eLOD ₅₀	

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

0.7 × LIL = 0.98

LOD₅₀ de AOAC OMA 2016.01 se asumió como 1

eLOD₅₀ = 0.98 CFU/porción

< 4 × 1



Resultados: eLOD₅₀ para la implementación de la verificación

Sección 5.6
& 8 Tabla 16
ISO 16140-3:2021

Tabla 3 — Protocolos para determinar el eLOD₅₀ y número de replicas necesarias por nivel de inoculación

Protocolo	Nivel de inoculación por porción					
	Nivel alto 9 × LOD ₅₀ / Porción	Nivel intermedio 3 × LOD ₅₀ / Porción	Nivel bajo 1 × LOD ₅₀ / Porción	3 CFU a 5 CFU / Porción	Blanco	Número total de replicas
1	1	4	4	—	1	10
2	—	—	—	—	1	9
3	—	—	—	7	1	8

Nota: la abreviatura de Unidades Formadoras de Colonia es CFU.

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



Proceso de verificación

Sección 5
ISO 16140-3:2021

A Implementación de la verificación

Completa! Eres capaz de ejecutar correctamente el método validado

B Verificación de Producto (alimento)

Sigue el mismo procedimiento para los productos (alimentos) en el alcance del laboratorio usuario





- 1 ¿El método esta validado? Lo está!
- 2 Seleccionar productos (Alimentos) para A y B
: *Completado para A y B*
- 3 **Determinar el eLOD₅₀**: *Planeado para A*
- 4 **Ejecutar el diseño experimental**: *Completado para A*



Verification process

Sección 5
ISO 16140-3:2021

- A Implementación de la verificación *Completa! Eres capaz de ejecutar correctamente el método validado*
- B Verificación de Producto (alimento) *Completa! Haz demostrado competencia en el usuario Laboratorio para ejecutar en método validado en las matrices evaluadas en el Laboratorio*

- 1 ¿El método esta validado? Lo está! 
- 2 Seleccionar productos (alimentos) para A y B: Realizado para A y B 
- 3 Determinar el eLOD₅₀: Hecho para A y B 
- 4 Ejecutar Diseño Experimental : Hecho para A yB 



Aplicacion del método cuantitativo de acuerdo a la ISO 16140-3

Uso dentro del Laboratorio



Ítem (Alimento)

Helado de vainilla	Cereal infantil con trigo, avena, azúcar, arroz	Pizza congelada de queso	Pasta lista para cocinar	Esponjas con caldo Letheen
Helado de vainilla con trozos de chocolate	Leche en polvo deshidratada	Pizza suprema congelada	Tortellini de espinacas y queso listos para cocinar	Hisopos con caldo Letheen
Helado de Vainilla con salsa de chocolate y almendras	Fórmula infantil láctea a base de suero	Pizza congelada de salchicha y anchoas	Tortellini de queso listo para cocinar	

Conoce el método

3M™ Petrifilm™ *Enterobacteriaceae* Count Plate

NF VALIDATION de acuerdo a ISO 16140-2:2016

Alcance: *Todos los productos para consumo humano (amplia gama de alimentos, alimentos para animales y muestras ambientales industriales)*

Certificado e informe resumido del estudio, disponible en sitio

NF VALIDATION <https://nf-validation.afnor.org/en/foodindustry/enterobacteriaceae/>



AOAC OMA
2003.01

Product
Instructions

¿El método está completamente validado? Si está!



Definición del alcance de la aplicación en el laboratorio

Sección 4.4
ISO 16140-3:2021

Lácteos procesados termicamente	Fórmulas infantiles	Multicomponentes/Alimentos compuestos		Muestras ambientales
Helado de vainilla	Cereal infantil con trigo, avena, azúcar, arroz	Pizza congelada de queso	Pasta lista para cocinar	Esponjas con caldo Letheen
Helado de vainilla con trozos de chocolate	Leche en polvo deshidratada	Pizza suprema congelada	Tortellini de espinacas y queso listos para cocinar	Hisopos con caldo Letheen
Helado de Vainilla con salsa de chocolate y almendras	Fórmula infantil láctea a base de suero	Pizza congelada de salchicha y anchoas	Tortellini de queso listo para cocinar	

Tomado de Table A1 de la ISO 16140-3:2021

Gama limitada de alimentos

4 o menos categorías. El alcance estará restringido a las categorías probadas




Proceso de verificación

Sección 6

ISO 16140-3:2021

- A Implementación de la verificación
Determinar la desviación estándar intralaboratorio (S_{IR})
- B (Alimento) ítem verificación
Determinar el sesgo estimado (eBias)

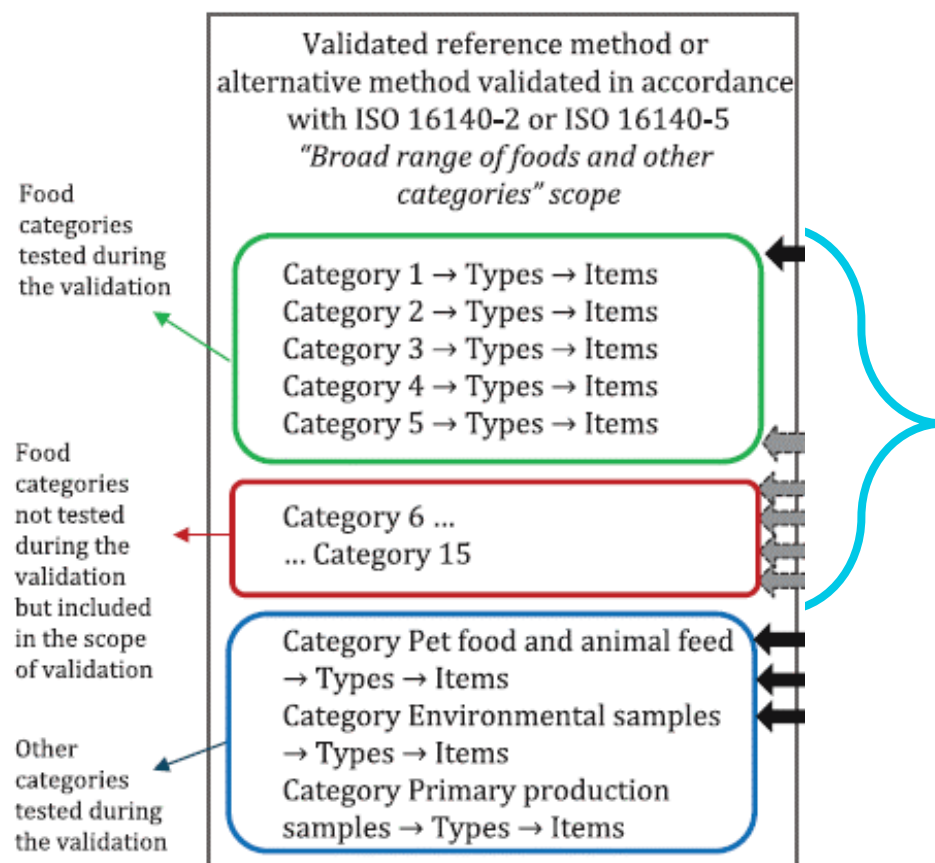
- 1 El método esta validado? Si esta! 
- 2 Seleccionar (alimento) item para la implementación de la verificación:
- 3 Ejecutar verificación de implementación
- 4 Selección (alimentos) para verificación de alimentos:
- 5 Ejecutar verificación de alimentos seleccionados:

Implementación de la verificación: Métodos cuantitativos

Sección 4

ISO 16140-3:2021

Alcance de la validación del método
Amplia gama de alimentos y otras categorías



Ámbito de aplicación del laboratorio
Rango limitado de alimentos y otras categorías

Implementación de verificación

Para métodos cuantitativos Seleccionar cualquier artículo (Alimento) que pertenezca al alcance de la validación del método, pero que no necesariamente se analizó en el estudio de validación.

Figure 6. ISO 16140-3:2021



Implementación de verificación: Protocolo

Sección 6.1.3

ISO 16140-3:2021

Paso 1. Elige la matriz (Alimento) para la verificación de la implementación

Para métodos cuantitativos: seleccionar la matriz (alimento) que pertenezca al alcance de la validación del método

Lácteos procesados térmicamente	Infant Formula	Multi-Component/Composite Foods		Environmental Samples
Helado de vainilla	Cereal infantil con trigo, avena, azúcar, arroz	Pizza congelada de queso	Pasta lista para cocinar	Esponjas con caldo Letheen
Helado de vainilla con trozos de chocolate	Leche en polvo deshidratada	Pizza suprema congelada	Tortellini de espinacas y queso listos para cocinar	Hisopos con caldo Letheen
Helado de vainilla con trozos de chocolate	Fórmula infantil láctea a base de suero	Pizza congelada de salchicha y anchoas	Tortellini de queso listo para cocinar	

El helado de vainilla es fácil de homogenizar y se puede recolectar fácilmente los lotes a usar







Verificación del proceso

Sección 6
ISO 16140-3:2021

- A** Implementación de verificación
Determinar la desviación estándar intralaboratorio (S_{IR})
- B** (Alimento) item verificación
Determinar el sesgo estimado (eBias)

- 1 El método esta validado? Si esta! 
- 2 Seleccionar (alimento) item para la implementación de la verificación: 
- 3 Ejecutar implementación de la verificación:
- 4 Selección (alimentos) para verificación de alimentos:
- 5 Ejecutar verificación de alimentos seleccionados:

Implementación de verificación

Paso 2. Diseño experimental

¿Qué necesitamos?

Mínimo 10 muestras pertenecientes a la misma matriz (Alimento)

- Cada muestra debe ser única. Por ejemplo, diferentes lotes o partidas.
- Tamaño de la porción: 10 g

El nivel de contaminación debe ser representativo o equivalente al rango de contaminación natural

- En este caso, 100 CFU/g a 10 000 CFU/g. Los ítems seleccionados de prueba se deben inocular con un nivel conocido de UFC
- *E. coli* ATCC 51813 aislado de los alimentos

Sección

6.1.2

ISO 16140-3:2021

Protocolo para contaminar de forma artificial las muestras

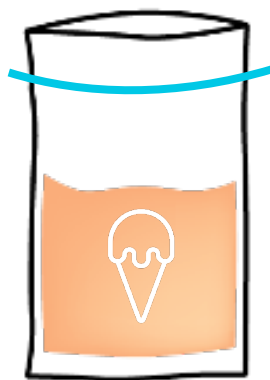
100–10 000 CFU/g



Paso 1 Consolidar la información

- Tamaño de la muestra: 10 g
- Concentración de cultivo madre: $\sim 1 \times 10^9$ CFU/mL
- Concentración objetivo: 1000 CFU/g

Paso 2 Trabajo Inverso



1000 CFU por 1 g



$1000 \text{ CFU} * 10 \text{ g} = 10\ 000$

ó

10 000 CFU / 10 g

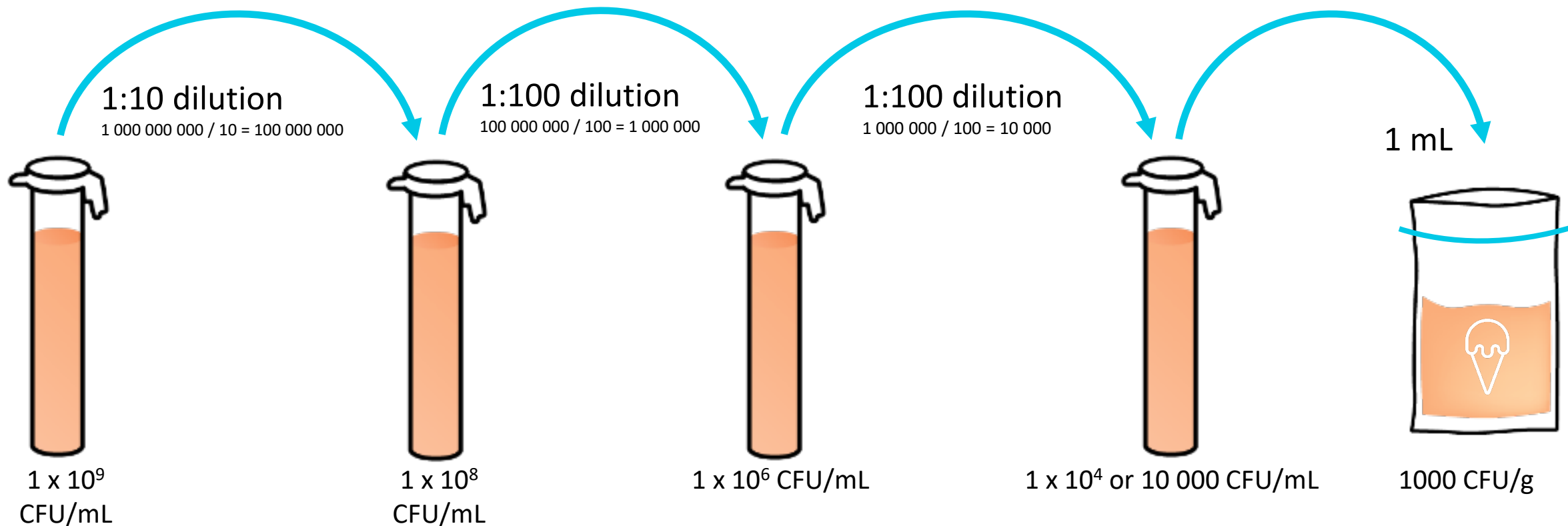


Necesitamos 1mL que contenga $\sim 10\ 000$ CFU

Protocolo para enriquecer muestras

Paso 3. Diluciones

Concentración: 10 000 CFU/mL





Verificación de la implementación

Paso 4. Repetir este paso para mínimo 10 Muestras seleccionadas

Figura 7
ISO 16140-3:2021

Condiciones para A

 Muestra de helado de vainilla homogenizado 

10 g por cada prueba

10 g por cada prueba

1:10 Dilución para cada prueba
Añadir 1 mL del cultivo diluido del paso 3

Realizar el análisis para Placas 3M™ Petrifilm™
Enterobacteriaceae por cada prueba

Resultado A

Resultado B

Condiciones para B

Marca

Marca

Lote A
Placas 3M™ Petrifilm™

Lote B
Placas 3M™ Petrifilm™

Lote A
Diluyente Peptona
(Solución salina)

Lote B
Diluyente Peptona
(Solución salina)



Implementación de la verificación

Tabla 10.
ISO 16140-3:2021

Paso 5. Consolidar resultados

- Calcular UFC/g (UFC x FD)
- Eliminar cualquier resultado que esté fuera del rango contable del método

Table 10 — Test results

Laboratory sample number	Expected contamination level cfu/g	Result A (x_{iA})	Result B (x_{iB})	Log_{10} result A $y_{iA} = \log_{10}(x_{iA})$	Log_{10} result B $y_{iB} = \log_{10}(x_{iB})$
		cfu/g	cfu/g		
1	30	< 40 (10)	< 40 (30)	≤ 1,60	≤ 1,60
2	300	110	182	2,04	2,26
3	300	410	620	2,61	2,79
4	600	640	330	2,81	2,52
5	600	690	570	2,84	2,76
6	600	780	640	2,89	2,81
7	600	620	1 300	2,79	3,11
8	600	870	1 500	2,94	3,18
9	6 000	8 600	6 400	3,93	3,81
10	6 000	16 000	5 000	4,20	3,70
11	6 000	> 15 000	13 400	> 4,18	4,13
12	30 000	20 000	32 000	4,30	4,51

- The results of laboratory samples 1 and 11 cannot be used because one of the counts was either too high (“>” result) or too low (below the permitted counting range in accordance with ISO 7218). The results of 10 laboratory samples remain for the calculation.
- Based on the 10 remaining laboratory samples, the S_{IR} can be calculated as shown in [Table 11](#).

Límite de aceptación para la implementación de la verificación

ISO 16140-3:2021 Sección 6.1.7

Límite de aceptación: “La desviación estándar de reproducibilidad intralaboratorio (S_{IR}) del método verificado debe ser $\leq 2X$ el valor medio más bajo de la desviación estándar de la reproducibilidad interlaboratorio de los alimentos utilizados en el estudio de validación.”

Bajo	Medio	Alto	Media
0,126	0,122	0,126	0,125



Table 11 - Summary of statistical tests

Accuracy profile	0,5			Application of clause 6.2.3 Step 8: If any of the values for the \bar{F} -ETI fall outside the acceptability limits, calculate the pooled average reproducibility standard deviation of the reference method. Step 9: Calculate new acceptability limits as a function of this standard deviation.		
Study Name	3M Petrifilm Enterobacteriaceae			FAUX		
Date						
Coordinator						
Tolerance probability (beta)	80%	80%	80%			
Acceptability limit in log (lambda)	0,50	0,50	0,50			
	Alternative method			Reference method		
Levels	Low	Medium	High	Low	Medium	High
Target value	2,274	3,238	4,191			
Number of participants (K)	14	14	14	14	14	14
Average for alternative method	2,224	3,244	4,223	2,274	3,238	4,191
Repeatability standard deviation (sr)	0,122	0,110	0,104	0,065	0,045	0,102
Between-lab standard deviation (sL)	0,034	0,052	0,071	0,088	0,095	0,070
Reproducibility standard deviation (sR)	0,126	0,122	0,126	0,109	0,105	0,124
Corrected number of dof	26,745	25,758	23,978	18,466	15,645	23,988
Coverage factor	1,339	1,343	1,349			
Interpolated Student t	1,314	1,315	1,318			
Tolerance interval standard deviation	0,1283	0,1245	0,1291			
Lower TI limit	2,056	3,080	4,053			
Upper TI limit	2,393	3,408	4,393			
Bias	-0,050	0,006	0,032			
Relative Lower TI limit (beta = 80%)	-0,218	-0,158	-0,138	FAUX		
Relative Upper TI limit (beta = 80%)	0,119	0,169	0,203	FAUX		
Lower Acceptability Limit	-0,50	-0,50	-0,50			
Upper Acceptability Limit	0,50	0,50	0,50			
New acceptability limits may be based on reference method pooled variance						
Pooled repro standard dev of reference	0,113					

Implementación de la verificación: Análisis de data

1

2A

2B (optional)

ISO Microbiology of the food chain - Method validation Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory
International Standard ISO 16140-3:2021

Cell colour coding: Enter data Calculated results Deviance

NOTE: initially, this excel sheet shows the valid data (Laboratory sample numbers 2,3,4,5,6,7,8,9,10,12) from the EXAMPLE in Table 10 and Table 11, but these can be replaced by yo

Table 10 Number of samples used in calculations

Laboratory sample (or test sample) number: 10

Test portion number and duplicate ID: 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 6A, 6B, 7A, 7B, 8A, 8B, 9A, 9B, 10A, 10B, 11A, 11B

Result per test portion expressed as: cfu/g or ml, log₁₀ cfu/g or ml

----- Minimum of 10 samples required -----																							
		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
		1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B	6A	6B	7A	7B	8A	8B	9A	9B	10A	10B	11A	11B
cfu/g or ml		180	182	410	620	640	330	690	570	780	640	620	1300	870	1500	8600	6400	16000	5000	20000	32000		
log ₁₀ cfu/g or ml		2.26	2.26	2.61	2.79	2.81	2.52	2.84	2.76	2.89	2.81	2.79	3.11	2.94	3.18	3.93	3.81	4.20	3.70	4.30	4.51		

Table 11 S_{IR} calculation

Absolute difference |Y_{IA} - Y_{IB}|: log₁₀ cfu/g or ml

Squared difference |Y_{IA} - Y_{IB}|²

Sum of squared differences: 0.6020

Sum of squared differences / (2 * 10): 0.0301

√(Sum of squared differences / (2 * 10)) = S_{IR}: 0.17

6.1.7 Acceptability limit

The S_{IR} shall be ≤ 2 x the lowest mean value of the S_R of the (food) items used in the validation study

S_{IR}: intralaboratory reproducibility standard deviation; S_R: interlaboratory reproducibility standard deviation

From the published validation data of the method: Lowest mean S_R: 0.125

Acceptability limit evaluation (S_{IR} ≤ 2 x S_R): Accepted

3

Excel Calculation Tool ISO 16140-3:2021 for assistance on statistics



Proceso de verificación

Section 6

ISO 16140-3:2021

A Implementación de la verificación *Hecho! Podra usar el método validado*

B (Alimento) Ítem de verificación
Determinar el sesgo estimado (eBias)

1 El método ha sido validado? Si, it is! 

2 Seleccionar (alimento) item para la implementación de la verificación: Completado 

3 Ejecutar verificación de implementación: Completado 

4 Selección (alimentos) para verificación de alimentos:

5 Ejecutar verificación de alimentos seleccionados:

(Alimento) Ítem de verificación

Sesgo estimado (eBias)

Section 4.4

ISO 16140-3:2021

Selección ítems de alimentos: Seleccionar un ítem (El mas desafiante) por cada categoría, teniendo en cuenta el alcance del laboratorio

En el Laboratorio				
Lácteos procesados térmicamente	Formula infantil	Multicomponentes /Alimentos compuestos		Muestras ambientales
Helado de vainilla	Cereal infantil con trigo, avena, azúcar y arroz	Pizza de queso congelada	Pasta lista para cocinar	Esponjas con caldo Letheen
Helado de vainilla con trozos de chocolate	Leche en polvo deshidratada	Pizza suprema congelada	Listo para cocinar: Tortellini rellenos de espinaca y queso listos para cocinar	Hisopos con caldo Letheen
Helado de vainilla con salsa de chocolate y almendras	Fórmula infantil láctea a base de suero	Pizza congelada de salchichas y anchoas	Tortellini de queso listos para cocinar	

(Alimento) Item de Verificación

Anexo B
ISO 16140-3:2021

Matrices desafiantes

Carga microbiana

Componentes antimicrobianos e inhibidores de crecimiento

Características fisicoquímicas
(Ejm pH, Aw, color, Viscosidad)

Composicion
(Ejm Alto contenido de grasa, polifenoles)

Lácteos procesado térmicamente	Fórmulas infantiles	MultiComponentes/Alimentos compuestos		Muestras ambientales
Helado de vainilla con salsa de chocolate y Almendras	Leche en polvo deshidratada	Pizza congelada de salchicha y anchoas	Tortellini de espinacas y queso listos para cocinar	Esponjas con caldo Letheen
Color (chocolate) Composición (Alta grasa and Viscosidad baja) ✓	Baja actividad de agua ✓	Contenido de alta Sal ✓	Carga microbiana (Cultivo de alimentos fermentados) Polifenoles ✓	Alta carga microbiana (Comparada con Muestras de hisopo) ✓







Proceso de verificación

Sección 6

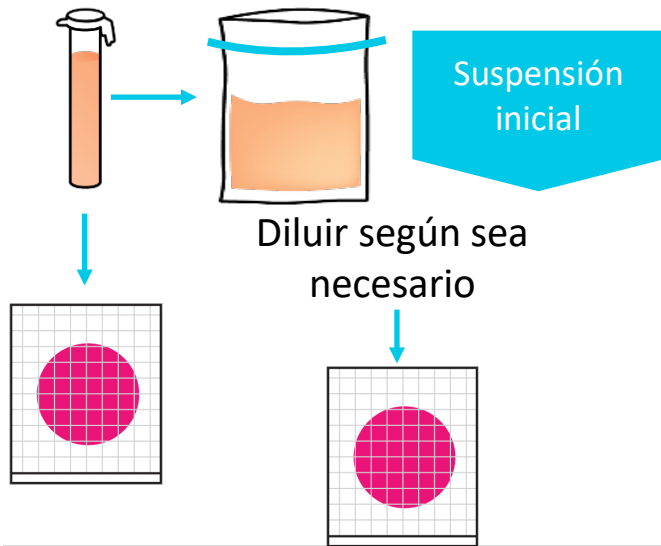
ISO 16140-3:2021

- A Verificación de la implementación
Determinar la desviación estándar intralaboratorio (S_{IR})
- B (Alimento) ítem de verificación
Determinar el sesgo estimado (eBias)

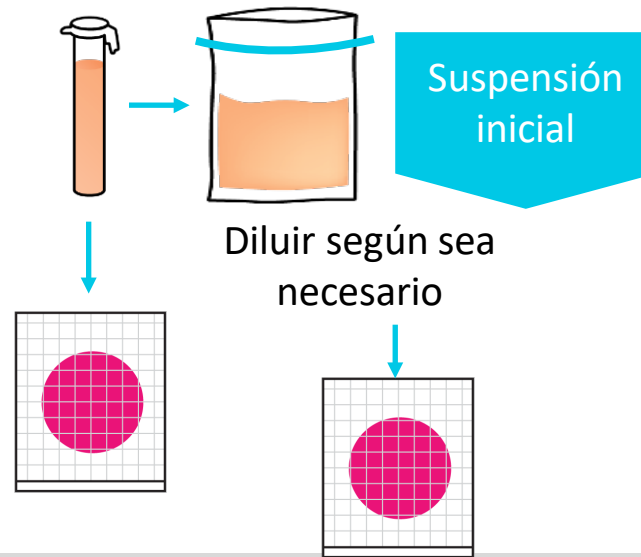
- 1 El método ha sido validado? Sí! 
- 2 Seleccionar el (Alimento) ítem para la verificación de la implementación: Hecho! 
- 3 Ejecutar la verificación de la implementación: Hecho 
- 4 Seleccionar el (Alimento) ítem de la verificación: Hecho 
- 5 Ejecutar el ítem de verificación:

(Alimento) Ítem de verificación: Diseño experimental

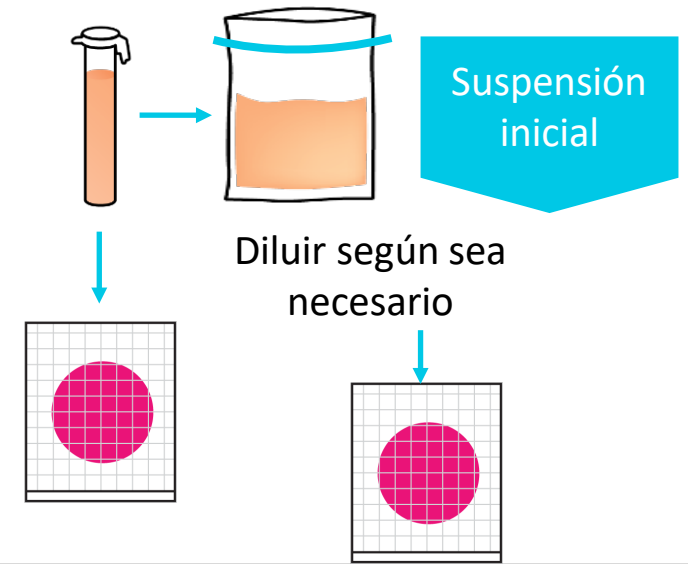
Nivel bajo
100 CFU/g to 1000 CFU/g



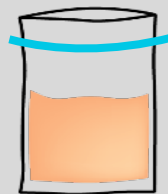
Nivel medio
1000 CFU/g to 5000 CFU/g



Nivel alto
5000 CFU/g to 10 000 CFU/g

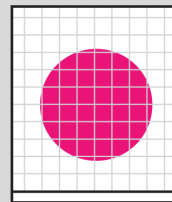


Inoculado



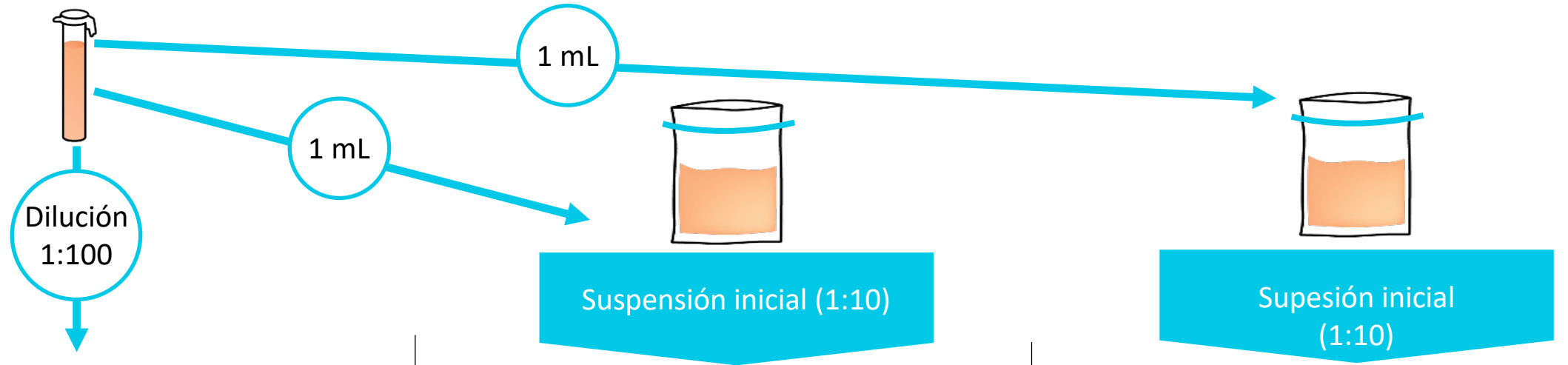
Suspensión inicial

Diluir según sea necesario

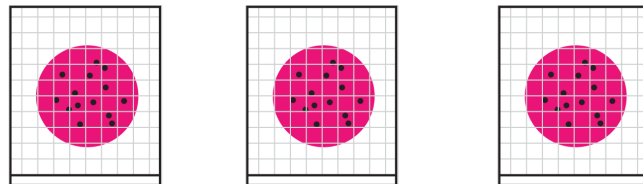


(Alimento) Ítem de verificación: Diseño experimental

Nivel bajo

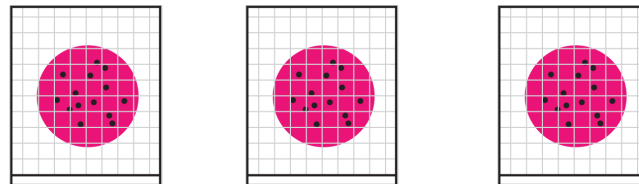


Diluir según sea necesario



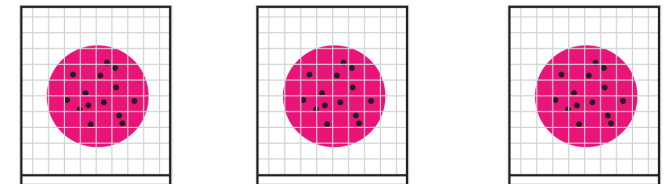
Dilución	1:100	1:1000	1:10 000
Conteo	85	6	0

Diluir según sea necesario



Dilución	1:10	1:100	1:1000
Conteo	79	9	0

Diluir según sea necesario



Dilución	1:10	1:100	1:1000
Conteo	84	8	0

(Food) Ítem de verificación: Límite de aceptación

Sección 4.4
ISO 16140-3:2021

Calculation and evaluation tool for verification of the estimated bias (eBias) (ISO 16140-3, 2021)

6.2.5 Evaluation of results

Compare the results of the artificially contaminated (food) item to the results of the inoculum suspension

*This calculation sheet is based on the use of a 10-gram test portion inoculated with 1 ml of inoculum suspension

Contamination level	Level 1	
Laboratory sample (or batch)	1	
Test portion number	1	2
Result per test portion in cfu/g or ml	790	840
Result per test portion in \log_{10} cfu/g or ml	2.90	2.92
Mean result per laboratory sample in \log_{10} cfu/g or ml	2.91	
Mean result in \log_{10} cfu per laboratory sample*	3.91	
Concentration inoculum suspension in cfu/ml	8500	
Concentration inoculum suspension in \log_{10} cfu/ml	3.93	
Determined eBias	0.02	
Acceptability limit ($eBias \leq 0,5 \log_{10}$)	Accepted	

6.2.6 Acceptability limit

It is expected that, at each level, the absolute difference between the results of the artificial contamination and the results of the inoculum suspension is not greater than the determined eBias

Test de prueba A
790 CFU/g

Test de prueba B
840 CFU/g

Concentración de inóculo en
suspensión: 8500 CFU/mL

Límite de
aceptación
 $\leq 0.5 \log_{10}$








Excel Calculation Tool ISO 16140-3:2021
for assistance on statistics



Proceso de verificación

Sección 6
ISO 16140-3:2021

- A Verificación de la implementación: *Ya está! El método validado puede ser usado.*
- B (Alimento) ítem verificación *Ya está! Usted ha demostrado la competencia del los usuarios y el laboratorio para desarrollar el método con las matrices verificadas en el laboratorio.*

- 1 Este método esta validado? Sí 
- 2 Seleccione un (Alimento) ítem para la verificación de la implementación: Hecho 
- 3 Ejecutar la implementación de la verificación: Hecho! 
- 4 Seleccionar (Alimento) ítems para la verificación: Hecho! 
- 5 Ejecutar la verificación de los ítems (Alimentos): Hecho 



Live Q&A



Gabriela Stancanelli
Professional Service Manager
3M Food Safety SOCO



Gustavo González
PS Pathogen Specialist
3M Food Safety LATAM