

אימות שיטות בדיקה מיקרוביולוגיות במזון על פי תקן ISO 16140-3

**ד"ר גלית צברי
יועצת איכות ורגולציה
בודקת מקצועית של הרשות**

נושאי ההרצאה

1. סקירת סדרת תקני ISO 16140 והכרת תקן ISO 16140-3.
2. הגדרות עיקריות
3. קבוצות מזון
4. גודל מדגם
5. אימות שיטה איכותית
6. אימות שיטה כמותית
7. אי ודאות המדידה
8. סיכום

סדרת תקני ISO 16140

סדרת תקני ISO 16140 מיועדת לתיקוף ואימות שיטות מיקרוביולוגיות במזון.
ישנם 7 חלקים לתקן על פי החלוקה הבאה:

- *Part 1: Vocabulary*
- *Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method*
- *Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory*
- *Part 4: Protocol for single-laboratory (in-house) method validation*
- *Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation of non-proprietary methods (Used to validate new reference methods across multiple laboratories).*
- *Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures*
- *Part 7: Protocol for the validation of identification methods of microorganisms*

תקן ISO 16140 חלק 3

מטרת התקן: להגדיר פרוטוקול להפגנת היכולת של מעבדה בודדת לבצע כראוי:

1. שיטת ייחוס (Reference Method) - לרוב שיטה מתוקננת (ISO, EN וכו').

1. שיטה חלופית מתוקפת (Validated Alternative Method) - לפי ISO 16140-2.

המטרה העיקרית: להבטיח שביצועי השיטה במעבדה הבודדת תואמים לביצועים שהוצגו במהלך התיקוף המקורי.

הגדרות עיקריות הרלוונטיות

לחלק 3

LOD₅₀ : (Level of Detection) הריכוז המינימלי המשוער של מיקרואורגניזמים CFU/ gr or ml **שמוזהה ב-50%** מהפעמים שנבדקו (שיטת בדיקה איכותית).

eLOD₅₀ : הערכת הערך LOD₅₀ של המעבדה הבודדת כפי שחושב על בסיס הנתונים שנאספו בניסוי האימות המבוצע במעבדה הבודדת.

הגדרות עיקריות הרלוונטיות

לחלק 3

Bias : אומדן של טעות מדידה שיטתית, או ההפרש השיטתי בין הערך הכמותי שהוקצה לבין הממוצע של תוצאות המדידה החוזרת (שיטת בדיקה כמותית).

eBias : ההטיה המשוערת של השיטה כפי שנמדדה במעבדה הבודדת. זהו ההפרש הממוצע בין התוצאה הנמדדת (ביחידות של Log_{10}) לבין הריכוז הידוע של ההזרעה יחידות הנמדדת (ביחידות של Log_{10})
דוגמה אופיינית ל- **eBias** שכולם אוהבים להשתמש $\pm 0.5 \log_{10}$

הגדרות עיקריות הרלוונטיות

לחלק 3

Reproducibility (R): דיוק המדידה בתנאי בדיקה שונים (ריאגנטים/ מצעים שונים, עובדים שונים, ציוד שונה, וכו').

Intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR})
סטיית תקן המתקבלת מתוצאות המדידה שנעשו במעבדה בתנאים השונים.

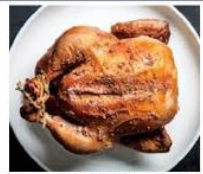
הגדרות עיקריות הרלוונטיות

לחלק 3

אימות יישום שיטה (Implementation Verification): בחינת יכולת המעבדה לבצע את השיטה באופן כללי, באמצעות פריט מזון אחד אשר נבדק במהלך התיקוף (לשיטה איכותית), או פריט מזון מאחת הקטגוריות שנבדקו במהלך התיקוף (לשיטה כמותית). תוצאות הבדיקה מושוות לתוצאות שהתקבלו בתיקוף השיטה.

אימות פריט מזון (Food Item Verification): בחינת יכולת המעבדה לבצע את השיטה על פריטי מזון ספציפיים שנמצאים בקטגוריות המזון שתוקפו אך, לא נבדקו בתיקוף המקורי, והם נמצאים בתחום היישום של המעבדה.

קטגוריות המזון המשמשות לתיקוף ואימות שיטות בדיקה

 RAW MILK & DAIRY	 HEAT TREATED DAIRY	 RAW MEAT	 READY TO EAT MEAT	 RAW POULTRY	 PET FOOD AND ANIMAL FEED
 READY TO EAT POULTRY	 EGGS	 RAW FISH	 READY TO EAT FISHERY	 FRESH PRODUCE & FRUITS	 ENVIRONMENTAL SAMPLES (food and feed production)
 PROCESSED FRUITS & VEG.	 DRIED VEGETABLES/NUTS	 INFANT FORMULA	 CONFECTIONARY	 MULTICOMPONENTS	 PRIMARY PRODUCTION SAMPLES (PPS)

טבלה A.1 בתקן מציינת את קטגוריות המזון והרלוונטיות שלהן
לבדיקת המיקרואורגניזמים השונים

מספר קטגוריות המזון הנדרשות לתיקוף שיטות

סה"כ ישנן 15 קטגוריות של מזון שהוגדרו.

שיטה שתוקפה "בטווח רחב" (Broad range) תכלול מזונות
מ-5 קטגוריות שונות לפחות.

שיטה שתוקפה "בטווח מצומצם" (limited range) תכלול
מזונות מ-4 קטגוריות מזון ופחות.

מספר דוגמאות המזון הנדרשות לאימות שיטות

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

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

דגימות מזון נדרשות באימות שיטות שתוקפו לטווח רחב

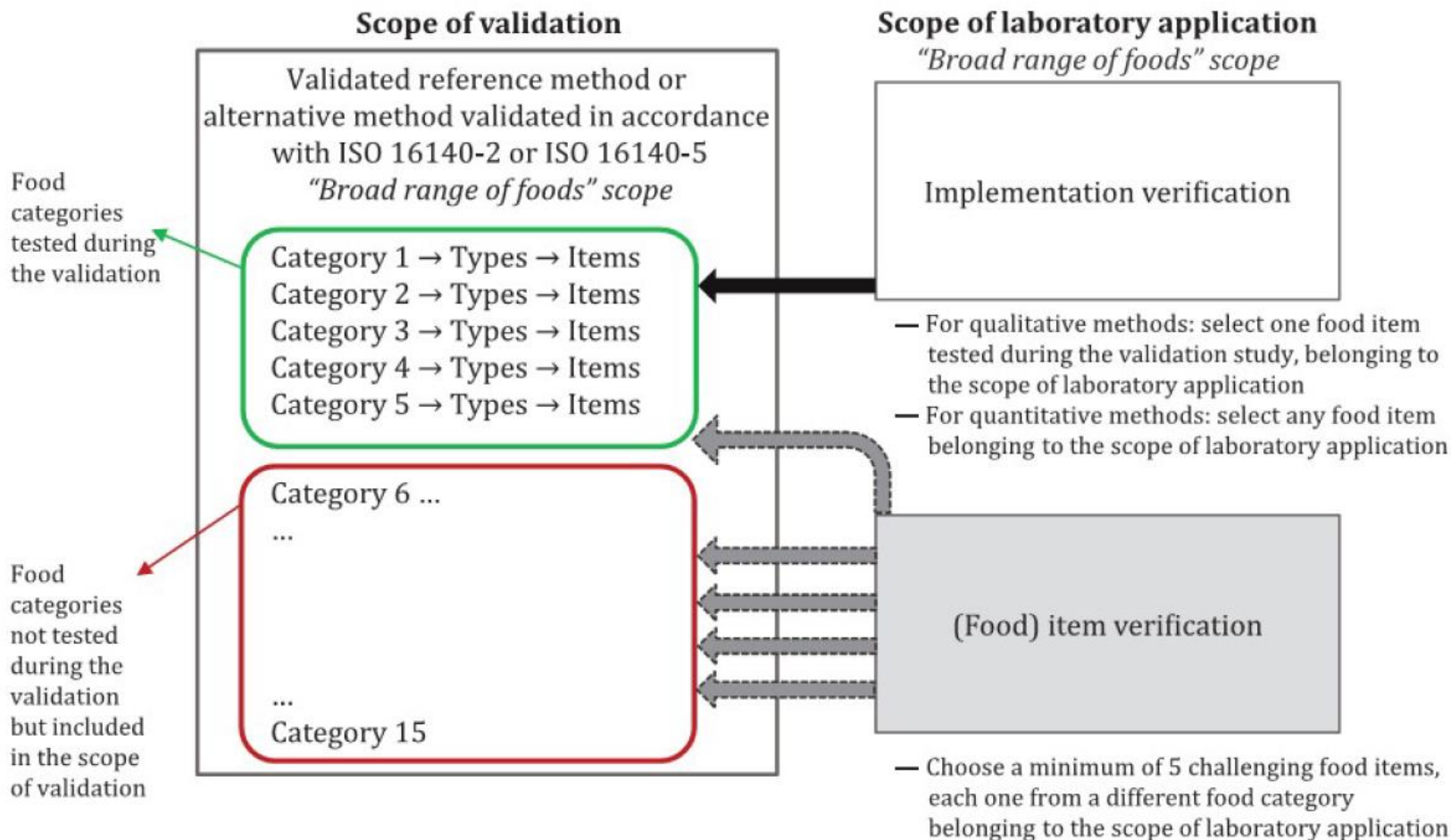


Figure 4 — Food items required when verifying a method for a "broad range of foods" scope

דגימות מזון נדרשות באימות שיטות שתוקפו לטווח מוגבל

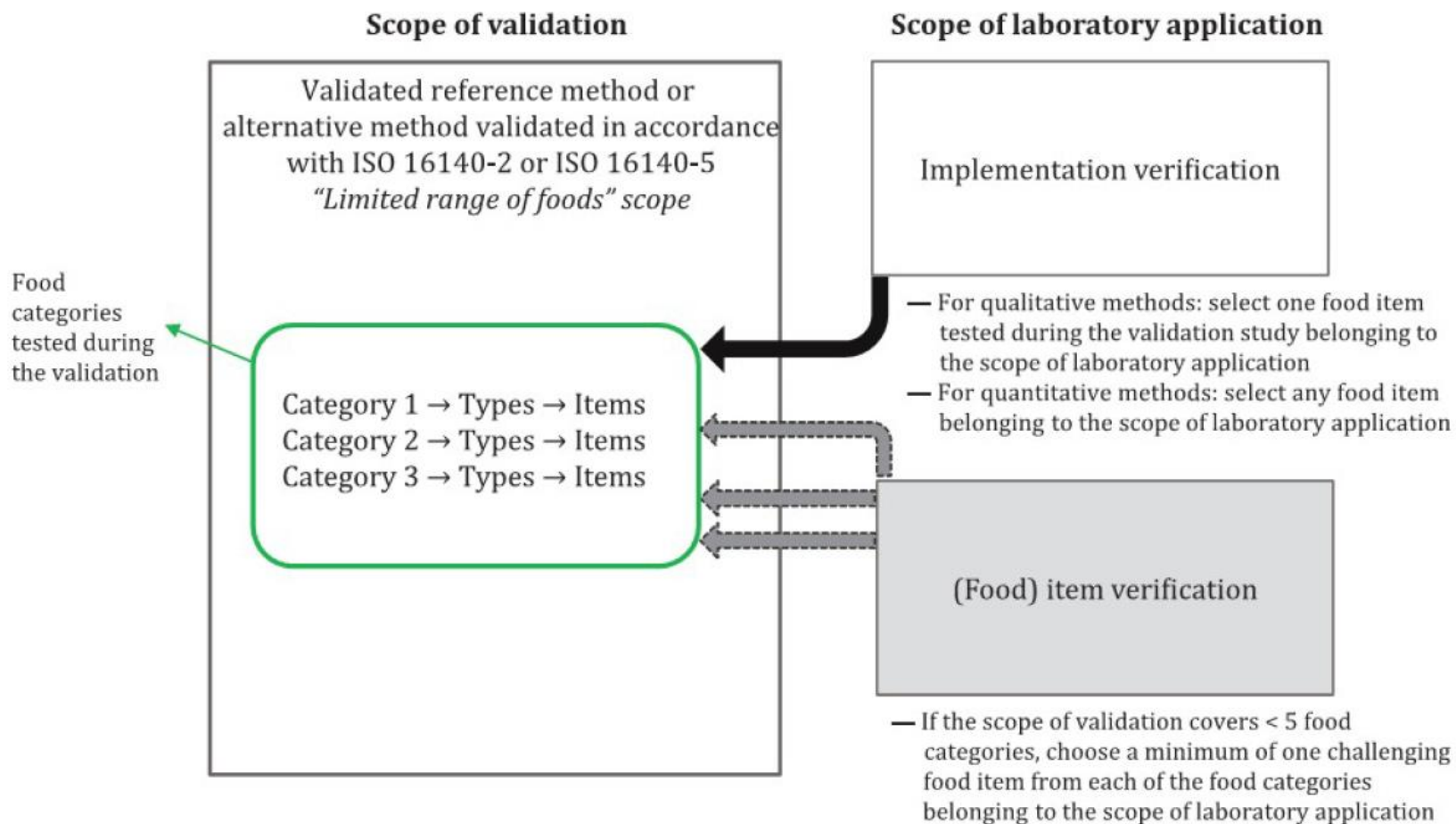


Figure 5 — Food items required when verifying a method for a "limited range of foods" scope

מאפייני הביצועים הנדרשים באימות שיטות

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.

אימות שיטה איכותית- קביעת $eLOD_{50}$ בחירת פרוטוקול האימות

- ישנן 3 אפשרויות (פרוטוקולים) של תיקוף שיטה איכותית.
פרוטוקול מס' 1 - יכול לשמש לאימות השיטה כאשר ישנה
אי ודאות לגבי השגת רמות האילוח של הדגימות. רלוונטי כאשר
אין מידע מקדים לרמת האילוח האמיתית.
- פרוטוקול מס' 3 - יכול לשמש כאשר רמות האילוח ידועות מראש.
לדוגמא: שימוש במוצרים המוכנים לשימוש עם ריכוז חיידקי
רפרנס ידוע מראש.
- פרוטוקול מס' 2 - ישמש כאשר התוצאות שהתקבלו בפרוטוקול
הנבחר המקורי (דהיינו 1 או 3), לא עמדו בציפיות ויש צורך
לחזור על הבדיקות.

אימות שיטה איכותית - קביעת $eLOD_{50}$

Table 3 — Protocols to determine $eLOD_{50}$ and number of replicates needed per inoculation level

Protocol	Inoculation level of the test portion					Total number of replicates
	High level $9 \times LOD_{50}$ / test portion	Intermediate level $3 \times LOD_{50}$ / test portion	Low level $1 \times LOD_{50}$ / test portion	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 cfu.

אימות שיטה איכותית- קביעת $eLOD_{50}$

דוגמה לרמות אילוח בהתאם לטבלה:
בתקן ISO 6579-1 לגילוי זני סלמונלה, נקבע שה- LOD_{50} של
השיטה הוא $2.5 \text{ CFU}/25\text{g}$.

על פי הטבלה, רמות האילוח ($\text{CFU}/25\text{g}$) הן:

$9 \times LOD_{50}/25\text{g}$	$3 \times LOD_{50}/25\text{g}$	$1 \times LOD_{50}/25\text{g}$
$2.5 \times 9 = 22.5$	$2.5 \times 3 = 7.5$	$2.5 \times 1 = 2.5$

אימות שיטה איכותית- קביעת $eLOD_{50}$

קובעים את ה- $eLOD_{50}$ בהתאם לטבלאות 6 או 8 עבור פרוטוקול 1 ו-2, בהתאמה שבתקן. עבור פרוטוקול 3, אין קביעה של $eLOD_{50}$, אלא הצלחה בקבלת תוצאות חיוביות באילוח של 3-5 CFU/ 25g.

קריטריוני הקבלה:

1. כל הדגימות של האילוח הגבוה תהיינה חיוביות.
2. כל הדגימות של ה-blank (ביקורת שלילית) תהיינה שליליות.
3. $eLOD_{50} \leq 4 \times LOD_{50}$

במקרה של תקן ISO 6579-1 עם LOD_{50} של 2.5 CFU/ 25g, ה- $eLOD_{50}$ המקסימלי יהיה 10 CFU/ 25g

אימות שיטה כמותית

ישנם 2 פרמטרים הנדרשים לביצוע בכדי לתקף שיטה
כמותית:

1. Intralaboratory reproducibility standard deviation
(S_{IR})

2. eBias

קביעה של (S_{IR})

- לקביעה של (S_{IR}) נדרשות לפחות 10 דגימות מזון מאותו סוג מזון. חייב שיהיו מאצוות שונות או יצרנים שונים וכו'.
- רמות האילוח צריכות להיות ברמה הצפויה הטבעית או הידועה לסוג מזון זה.
- כל 2 דגימות מזון ישקלו יחדיו כדגימה אחת גדולה, תעורבב היטב לפני חלוקה ל- 2 מנות בדיקה.
- לאחר החלוקה, במידת הצורך, יבוצע אילוח של המנות.
- כל מנה תבדק ע"י עובד אחר, מצעים אחרים ואם אפשר גם ציוד אחר.

קביעה של (S_{IR})

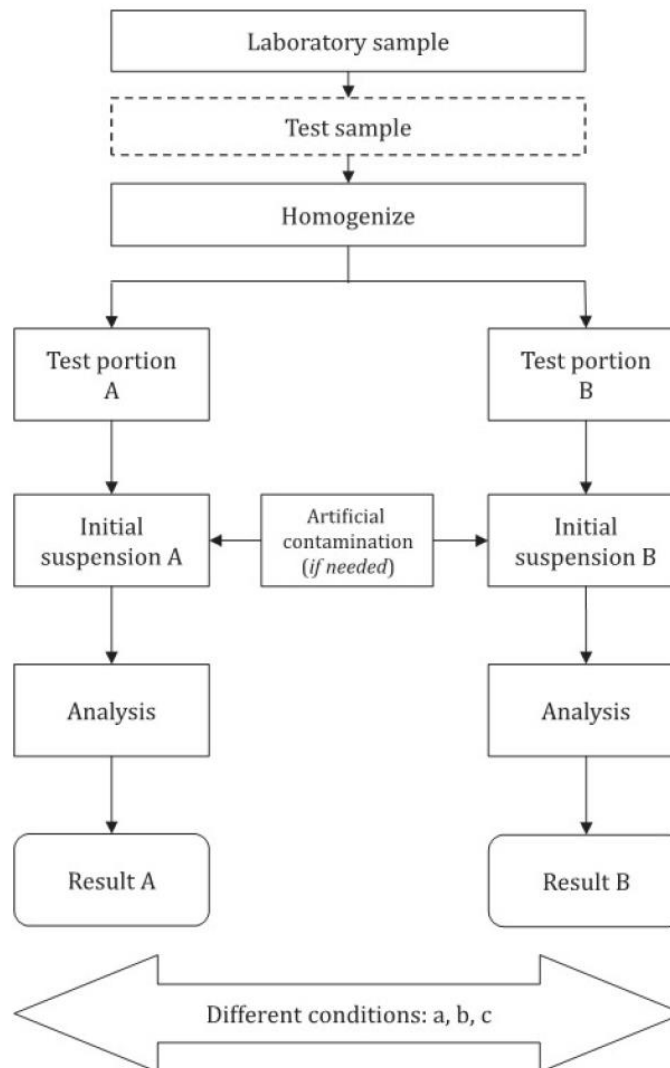


Figure 7 — Experimental protocol to estimate the intralaboratory reproducibility standard deviation (S_{IR})

קביעה של (S_{IR})

חישוב ת



S_{IR} is the intralab

i is the index of

n is the number

y_{iA}, y_{iB} are the log-tra
c, respectively

conditions a, b and

דוגמה לקביעה של (S_{IR})

תקן :

ISO 21528-2 detection and enumeration of
Enterobacteriaceae

דוגמת מזון - טירמיסו

דוגמה לקביעה של (S_{IR})

Table 10 — Test results

Laboratory sample number	Expected contamination level cfu/g	Result A (x_{iA}) cfu/g	Result B (x_{iB}) cfu/g	Log ₁₀ result A $y_{iA} = \log_{10}(x_{iA})$	Log ₁₀ result B $y_{iB} = \log_{10}(x_{iB})$
1	30	X < 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	X > 15 000	13 400	> 4,18	4,13
12	30 000	20 000	32 000	4,30	4,51

דוגמה לקביעה של (S_{IR})

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	X ≤ 1.602	≤ 1.602	Not used	Not used
2			0,218 7	0,047 8
3			0,179 6	0,032 3
4			0,287 7	0,082 8
5			0,083 0	0,006 9
6			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	X $> 4,176$	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

$$S_{IR} = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2}$$

where

דוגמה לקביעה של (S_{IR})

קריטריון הקבלה:

$$S_{IR} \leq 2 \times \text{lowest } S_R$$

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

(Food) item	S_R values from the validation study			
	Low inoculation level	Intermediate inoculation level	High inoculation level	Mean value of three inoculation levels
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

ערך ה- S_R הנמוך ביותר שהתקבל הוא 0.18.

ערך ה- S_{IR} שנקבע במעבדה הוא גם 0.18, לכן במקרה זה

ה- $S_{IR} = S_R$.

eBias נדרש אך ורק עבור אימות פריט מזון
(Food Item Verification) ולא עבור אימות
יישום השיטה (Implementation Verification)

תכנון הניסוי לקביעת eBias

1. בחירה של דוגמת מזון אחת (לפחות) מכל קטגוריית מזון שלא תוקפה.
2. אילוח של הדוגמה ב- 3 רמות של אילוח, בדופליקטים. רצוי שכל רמת אילוח תבוצע באותו סוג מזון אולם מאצווה אחרת, יצרן אחר וכו'.
3. מצע הגידול, ללא דוגמת מזון, יאולח באותו האופן וישמש כביקורת שלילית.

תכנון הניסוי לקביעת eBias

4. רמות האילוח יהיו בטווח שבין 10^1 - 10^5 CFU/
ml/

5. זריעה וספירת מושבות.

6. תוצאות ינתנו ביחידות של Log_{10} CFU/ test
portion

קריטריון קבלה:

בכל רמת אילוח, ההפרש האבסולוטי, בין תוצאות
הביקורת השלילית ודוגמאות המזון יהיה
 $<0.5 \text{ Log}_{10}$

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.				

אי ודאות השיטה

אימות שיטת בדיקה מתוקפת אינה נדרשת
בקביעה של אי ודאות.

אי ודאות המדידה (Measurement Uncertainty- MU),
אינו חלק מדרישות תקן ISO 16140
לחלקיו.

ISO 19036:2019

Microbiology of the food chain —
Estimation of measurement
uncertainty for quantitative
determinations

ישנו תקן ספציפי לקביעה
של אי ודאות המדידה

תקן ISO 19036

תקן זה מונה שלושה סוגים של רכיבי MU :

- אי ודאות טכנית technical uncertainty
- אי ודאות המטריצה matrix uncertainty
- אי ודאות התפלגותית distributional uncertainty

Instrumental methods such as ATP where no colonies or cells are counted: $u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2}$

Colony-count methods, without partial confirmation: $u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{Poisson}}^2}$

Colony-count methods, with partial confirmation: $u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{Poisson}}^2 + u_{\text{conf}}^2}$

MPN methods: $u_c(y) = \sqrt{u_{\text{tech}}^2 + u_{\text{matrix}}^2 + u_{\text{MPN}}^2}$

דעתי לגבי אימות שיטות וקביעת אי ודאות המדידה

על פי הנחיות הרשות, תקן ISO 16140 לחלקיו אינם מחייבים, אבל ההמלצה היא **כן** לחייב.
נוהל הרשות לתיקוף שיטות מס' 1-661004 אינו מצטט את תקן זה או את תקן ISO 19036. הוא מיועד ומוכוון לשיטות אנליטיות ופחות למיקרוביולוגיות.
כתיבת נהל יעודי לתיקוף ו/ או אימות של שיטות מיקרוביולוגיות (במזון). או לחילופין, לחייב מעבדות לבצע אימותי שיטות בדיקה במזון על פי הנחיות סדרת התקנים. כך תהיינה אחידות באימותי שיטות בין המעבדות המוסמכות.

תודה רבה

Galit Tsabary Ph.D
QA and RA Consultant

Address: 51 Meginei Ha'Galil st., Rehovot,
7620081, Israel
Mobile: +972-54-9706145
Email: gtsabary.consulting@gmail.com