

**Istituto Superiore di Sanità
Organismo Riconoscimento Laboratori
SINAL
SIT**

**L'ACCREDITAMENTO DEI LABORATORI PER LA SICUREZZA
ALIMENTARE**

Roma 25-26 Ottobre 2005

Validazione dei metodi microbiologici

Dr. Angelo Viti
A.R.P.A.T.
Dipartimento Prov.le Arezzo
viale Maginardo, 1 - 52100 Arezzo
Tel. 0575 939103
Fax 0575 939115
a.viti@arpat.toscana.it



Requisiti per l'adozione e l'utilizzo dei metodi di prova microbiologici

Il laboratorio deve adottare metodi e procedure appropriati per tutte le prove e/o tarature che rientrano nei suoi scopi

Questi includono :

Il campionamento ,
la manipolazione ,
il trasporto,
l'immagazzinamento,
la preparazione,

degli oggetti da provare e/o tarare, e quando appropriato,
una stima dell'incertezza di misura come pure le tecniche statistiche per
l'analisi dei dati di prova e/o taratura.

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2000 p.to 5.4.1

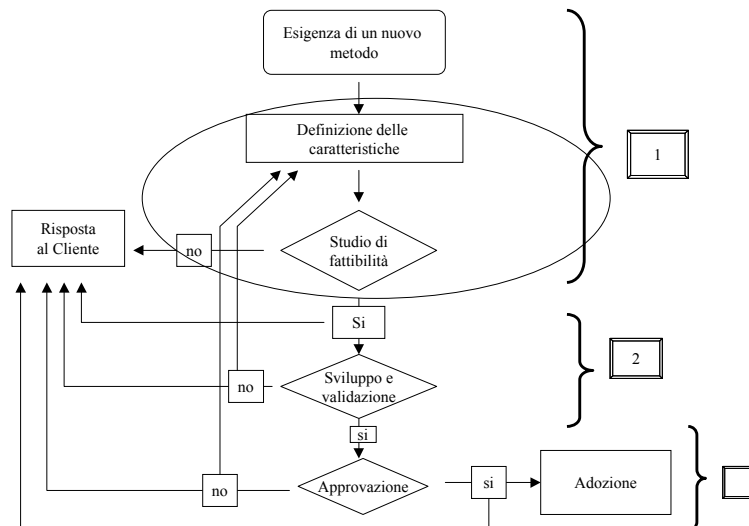


Adozione di un metodo nuovo metodo di prova

La scelta e l'adozione di un metodo di prova/taratura è uno dei fattori più critici del SQ di un laboratorio. Deve essere pianificato e gestito da personale altamente qualificato e coinvolge i massimi livelli decisionali della struttura.

La pianificazione deve almeno:

- ⇒ descrivere dell'intero processo
- ⇒ individuare i soggetti abilitati a richiedere l'adozione di un metodo di prova (input)
- ⇒ definire i criteri di valutazione della richiesta
- ⇒ individuare i livelli decisionali
- ⇒ individuare la conclusione del processo (output)
- ⇒ disciplinare i rapporti con il cliente



La richiesta di introdurre un nuovo metodo in laboratorio deriva:

- 1) dalle esigenze espresse o implicite del cliente (esterno o interno)
- 2) dalle proposte direzione tecnica del laboratorio
- 3) dalle esigenze/proposte dell'alta direzione



Esigenze implicite ed esplicite del cliente

- ⇒Adeguamento ad una normativa cogente
- ⇒Prestazioni del metodo (campo di applicazione, accuratezza, limite di rilevabilità, incertezza.....)
- ⇒Tempi di risposta
- ⇒Costo della prova
- ⇒.....



Esigenze della direzione tecnica del laboratorio:

- ⇒ adeguamento allo sviluppo delle conoscenze;
- ⇒ miglioramento delle prestazioni;
- ⇒ miglior utilizzo delle risorse umane, tecniche e finanziarie;
- ⇒ attuazione di azioni preventive su punti deboli rilevati in sede di riesame dei metodi e del SQ;
- ⇒ messa in qualità di una prova
- ⇒



Esigenze dell'alta direzione:

-]risposte ad esigenze del cliente
-]costo della prova
-]strategia aziendale
-]costi per lo sviluppo del nuovo metodo
-]tempi necessari per lo sviluppo
-].....



Definizione della richiesta

La funzione identificata o appositamente incaricata definisce i requisiti a cui deve rispondere il metodo ed in particolare definisce/studia:

- ® le performance del metodo (incertezza, accuratezza, robustezza, precisione, riproducibilità)
- ®tempi sviluppo del metodo
- ®Rassegna bibliografica dei metodi normalizzati utilizzabili o presenti nella letteratura specializzata.



VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI DI UN METODO

- 1) Sensibilità
- 2) Specificità
- 3) Robustezza
- 4) Precisione
- 5) Esattezza
- 6) Incertezza



SENSIBILITÀ

Probabilità che un risultato positivo sia effettivamente positivo o che l'assegnazione di una colonia al gruppo dei positivi sia corretta.

A = Risultato positivo

B = Falso negativo

$$\text{Sensibilità} = \frac{A}{A + B} * 100$$



SPECIFICITÀ

Probabilità che un risultato negativo sia effettivamente negativo o che l'assegnazione di una colonia al gruppo dei negativi sia corretta.

D = Risultato negativo

C = Falso positivo

$$\text{Specificità} = \frac{D}{D + C} \times 100$$



ROBUSTEZZA

La robustezza di un metodo rappresenta la capacità del metodo di non essere influenzato significativamente , per effetto di variazioni deliberate introdotte nelle sue fasi di realizzazione.

Tale parametro è fondamentale nelle prove chimiche, mentre ha un significato molto relativo nelle prove microbiologiche



PRECISIONE

Grado di accordo tra misure indipendenti della stessa variabile analitica.

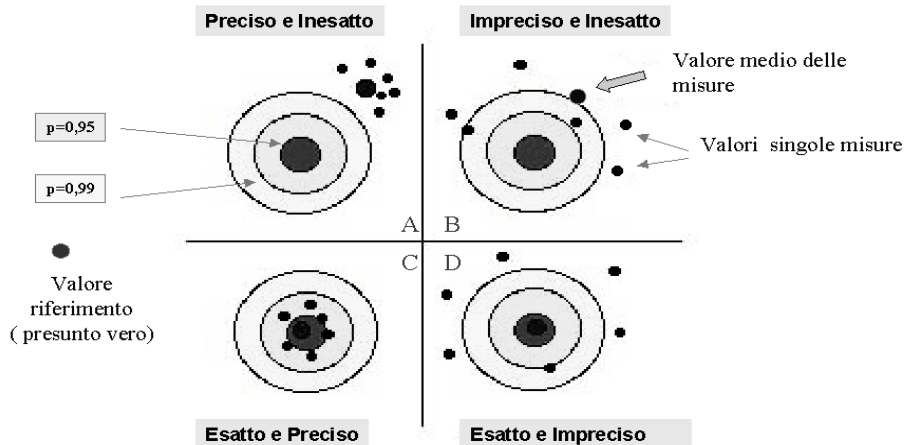
In funzione delle modalità con cui vengono replicate le prove, può essere definita come ripetibilità o come riproducibilità.

UNI ISO 5725-1:2004



ESATEZZA

Differenza tra il valore medio ottenuto da un sufficiente numero di prove indipendenti ed il valore di riferimento accettato come reale.



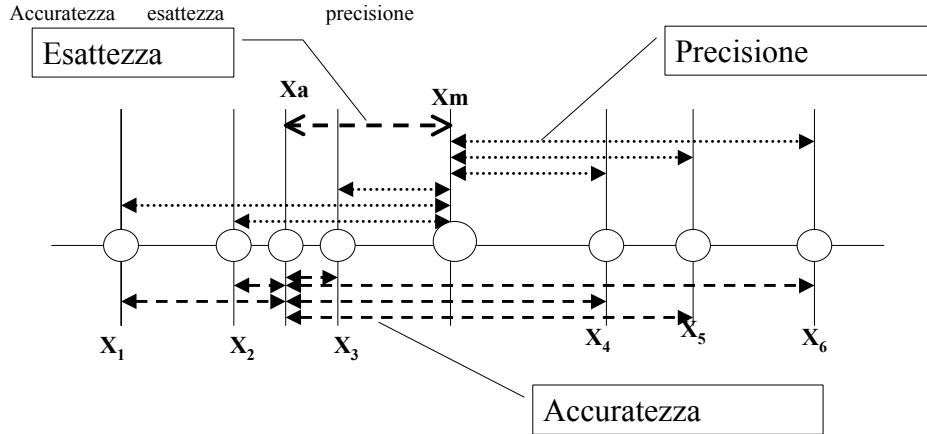
PRECISIONE = Differenza (scarto aleatorio) tra un singolo valore e la media degli n valori

ESATEZZA (accuratezza della media) = Differenza (scostamento) tra il valore presunto vero ed il valore medio degli n. valori

ACCURATEZZA = Differenza (scarto) tra il valore presunto vero ed il valore singolo del misurando



Scarto = scostamento \pm scarto aleatorio



INCERTEZZA

•Parametro associato al risultato di una misurazione o prova, che caratterizza la dispersione dei dati ragionevolmente attribuibili al misurando (Norma UNI CEI EN V 13005:2000).

•Stima che caratterizza il campo di valori entro cui giace il valore vero del misurando (Norma ISO 3534-1 :4993).

c) Parametro associato al risultato di una misurazione, che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando.

(VIM - Vocabolario Internazionale dei termini fondamentali e generali in metrologia , 1993).



SVILUPPO DEL PROCESSO

Studio di fattibilità

Verifica che il laboratorio ha la capacità di rispondere in modo positivo alla richiesta. In particolare esamina:

- ×le risorse umane, tecniche, strumentali e finanziarie necessarie per l'adozione del metodo
- ×L'eventuale necessità di adeguamento delle risorse a disposizione del laboratorio
- ×definizione dei criteri per la scelta del metodo (vedi norme qualità)
- ×caratteristiche tecniche del metodo
- ×criteri accessori: costi, sicurezza, tempi di sviluppo del metodo, numero di determinazioni previste

Lo studio di fattibilità può richiedere la stesura in bozza del metodo e l'esecuzione di alcune prove preliminari



SCELTA DEI METODI

Il laboratorio deve utilizzare metodi di prova e/o taratura, inclusi i metodi di campionamento, che soddisfino le esigenze del cliente e che siano appropriati per le prove e/o tarature da eseguire.

Si devono utilizzare preferibilmente i metodi pubblicati nelle norme internazionali, regionali o nazionali.

Il laboratorio deve garantire che sia utilizzata l'ultima edizione valida.

Metodi sviluppati dal laboratorio possono essere utilizzati se sono appropriati per l'uso previsto **e se sono validati**. Il cliente deve essere informato del metodo scelto.

Il laboratorio deve confermare che può correttamente eseguire i metodi normalizzati prima di metterli in opera per le prove e/o le tarature.....

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2000 p.to 5.4.2



I CRITERI DI SCELTA SONO, IN ORDINE DI PRIORITÀ:

- 1) Metodi cogenti (metodi ufficiali)
- 2) Metodi normati o normalizzati (ISO, UNI,)
- 3) Metodi redatti da organismi scientifici di riconosciuto prestigio (AOAC ISS ect) (l'organizzazione si assume la responsabilità del metodo)
- 4) Metodi pubblicati su riviste scientifiche (responsabilità dell'autore)
- 5) metodi sviluppati dal laboratorio



Il rapporto dello studio di fattibilità (con la proposta del metodo di adottare) è presentato alla funzione competente (responsabile tecnico del laboratorio), il quale decide come procedere. Il RGQ è informato dell'esito del risultato dello studio di fattibilità.

Il cliente è informato del risultato dello studio di fattibilità e prima di procedere deve essere chiarita ogni differenza tra richiesta e offerta (ISO 17025 :2000 p.to 4.4.1)



Concluso lo studio di fattibilità, si procede alla fase di sviluppo e sperimentazione:

Metodo Normato o comunque già scritto



La lingua con la quale è redatto è conosciuta dagli operatori?

L'applicazione del metodo richiede integrazioni? (vedi nota punto 5.4.1 ISO17025)

Metodo Sviluppato dal Laboratorio



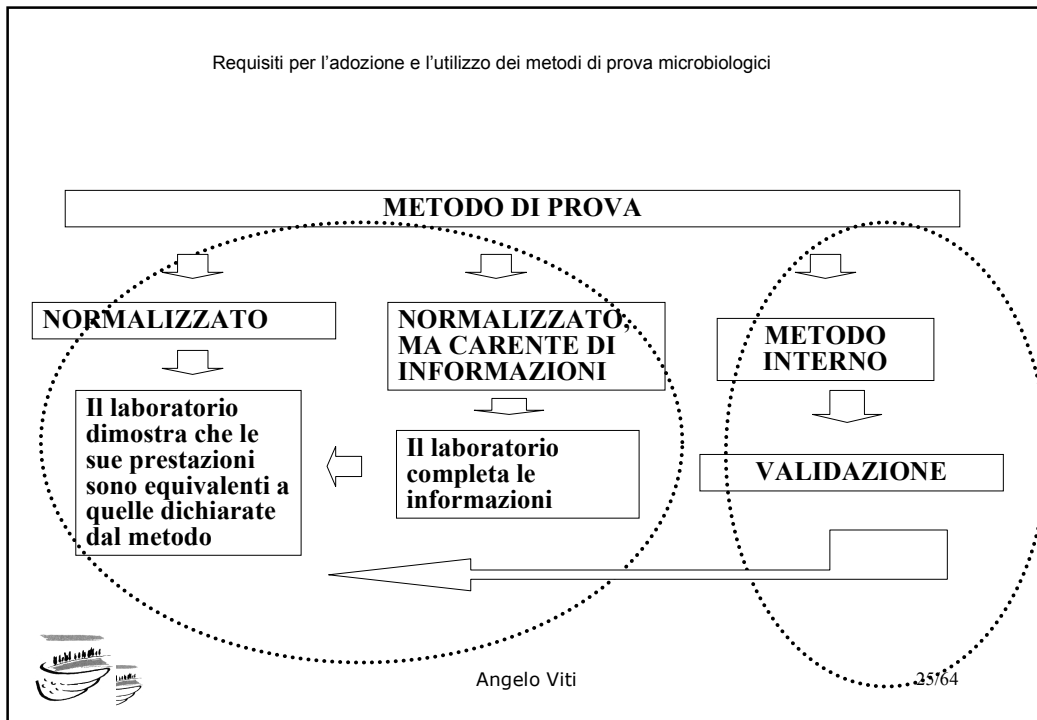
Stesura di una bozza

vedi 5.4.4. ISO 17025 o UNI ISO 7667



SVILUPPO VALIDAZIONE





METODI NORMALIZZATI

.....Il laboratorio deve confermare che può correttamente eseguire i metodi normalizzati prima di metterli in opera per le prove e/o le tarature..... (ISO 17025 5.4.2)

- I metodi normalizzati sono considerati comunque validati (..... idonei per l'uso.....), il laboratorio deve dimostrare di rientrare nei limiti della performances dichiarate nel metodo
- La non pubblicazione di una caratteristica, non esonera il laboratorio dalla sua conoscenza, soprattutto se questa è critica per l'idoneità all'uso, in relazione alla richiesta del cliente
- La dimostrazione della corretta esecuzione del metodo deve essere sempre dimostrata con evidenze oggettive



Validazione metodi microbiologici

Le tecniche utilizzate per la determinazione delle prestazioni di un metodo dovrebbero essere una, o una combinazione delle seguenti:

- taratura, utilizzando campioni o materiali di riferimento
- confronto dei risultati ottenuti con altri metodi
- valutazione sistematica dei fattori che influenzano il risultato
- stima dell'incertezza dei risultati sulla base di una conoscenza scientifica dei principi teorici del metodo e di un'esperienza pratica.

UNI CEI EN ISO/IEC 17025, nota 2 punto 5.4.5.2

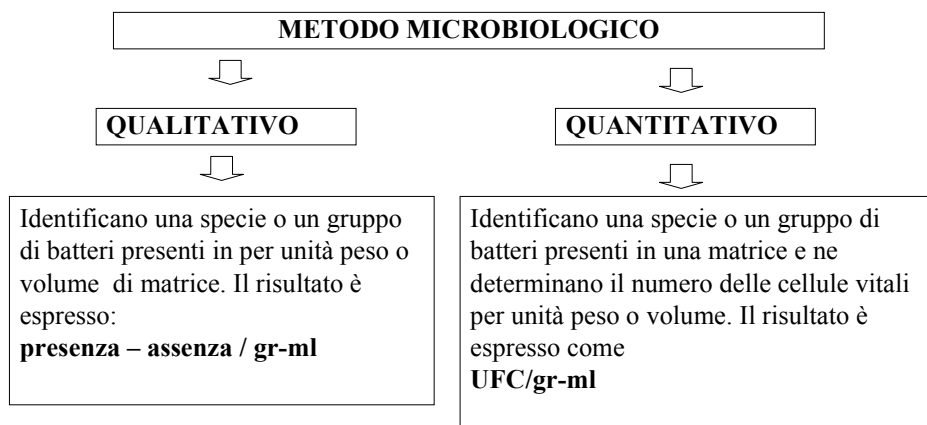


Validazione metodi microbiologici

- ***Validazione primaria:*** Studio delle caratteristiche del metodo in fase di messa a punto e sperimentazione
- ***Validazione Secondaria (Assicurazione della qualità):*** verifica dei risultati ottenuti con l'uso routinario del metodo.



CARATTERISTICHE METODI MICROBIOLOGICI



CARATTERISTICHE METODI MICROBIOLOGICI

I metodi microbiologici hanno caratteristiche peculiari:

1. non sono robusti (ISO TR 13843/2000 5.5)

Fattori che influenzano la robustezza

- a) le caratteristiche del campione (struttura chimico-fisica, distribuzione non omogenea della popolazione microbica);
- b) la competenza del personale;
- c) i terreni colturali;
- d) le modalità di preparazione (campionamento e rappresentatività della porzione esaminata) del campione;
- e) le condizioni (tempo e temperatura) di incubazione;

} **Sistema di rilevazione**



CARATTERISTICHE METODI MICROBIOLOGICI

2. Variabilità del campione : La distribuzione dei batteri all'interno di un campione non è omogenea, né è possibile ottenere omogeneità molto spinte senza danneggiare la vitalità delle le cellule batteriche stesse.

3. Recupero: non è possibile definire il recupero assoluto, però è possibile verificare il recupero relativo, confrontando i risultati ottenuti con due metodi diversi.

Dipende:

- a) L'efficacia del sistema rilevatore (terreno colturale)
- b) La vitalità del germe definita dalla crescita, cioè dal metodo stesso



CARATTERISTICHE METODI MICROBIOLOGICI

IL SISTEMA INFLUENZA IN MODO DETERMINANTE IL RISULTATO DELLE PROVE MICROBIOLOGICHE

- Processi di sterilizzazione
- Caratteristiche dei locali
- Gestione delle apparecchiature e approvvigionamento dei reagenti
- Qualificazione e formazione del personale
- Gestione corretta dei materiali di riferimento



Validazione: Metodi qualitativi

ISO/FDS 16140 :2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation alternative methods.

modello sperimentale

- **prove in doppio con un metodo di riferimento**
- **prove su campioni a contaminazione nota (circuito interlaboratorio o campioni contaminati in laboratorio)**

Fattori critici

- 1) Livello della contaminazione**
- 2) effetto matrice**
- 3) flora batterica interferente**



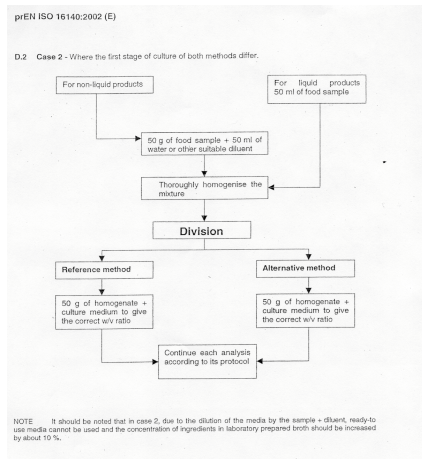
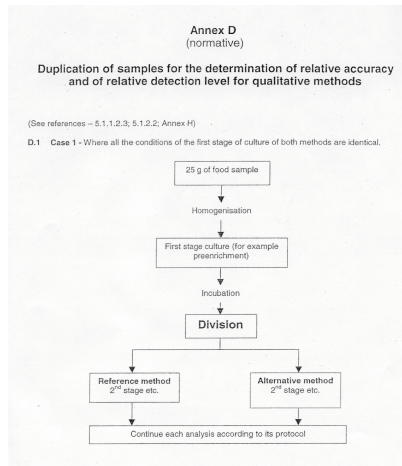
Validazione: Metodi qualitativi

VALUTAZIONE PARAMETRI:

- ⇒ **sensibilità**
- ⇒ **specificità**
- ⇒ **accuratezza**



Validazione: Metodi qualitativi modello sperimentale



Validazione: Metodi qualitativi

Metodo	RIF V. N.	Class.
+	+	PA
-	-	NA
+	-	PD
-	+	ND



Validazione: Metodi qualitativi

Sensibilità

$$S = \frac{PA}{PA+ND} * 100$$

la probabilità che un campione “vero positivo” risulti effettivamente tale utilizzando il metodo in esame

Specificità

$$Sp = \frac{NA}{NA+PD} * 100$$

la probabilità che un campione “vero negativo” risulti effettivamente tale utilizzando il metodo in esame

Accuratezza

$$A = \frac{PA+NA}{PA+NA+PD+ND} * 100$$

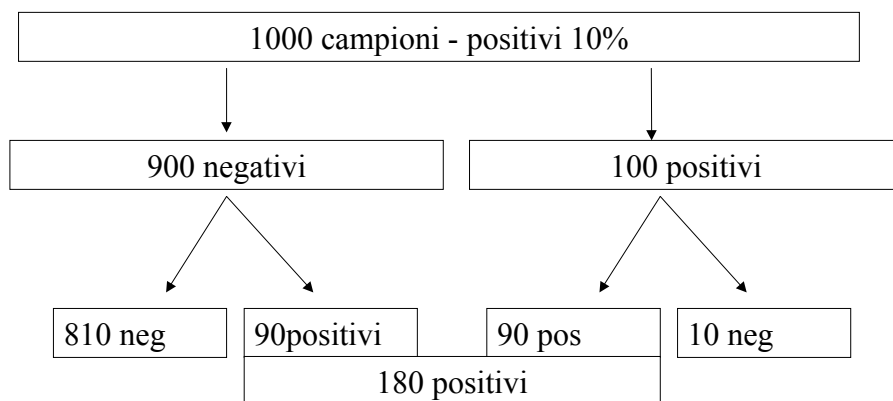
Grado di concordanza tra il metodo di riferimento (e/o valore vero) ed il metodo in esame



Requisiti per l'adozione e l'utilizzo dei metodi di prova microbiologici

Sensibilità = 90%

Specificità = 90%



**IL 50% DEI CAMPIONI
RISULTATI POSITIVI SONO
IN REALTÁ NEGATIVI**



VALIDAZIONE METODI QUANTITATIVI

VALUTAZIONE PARAMETRI:

- ⇒ **sensibilità**
- ⇒ **specificità**
- ⇒ **efficienza**
- ⇒ **selettività**

**La valutazione è fatta sulla corretta assegnazione di una colonia,
coltura, test al gruppo dei positivi o al gruppo dei negativi**



VALIDAZIONE METODI QUANTITATIVI

Conteggi confermati	Conteggi presuntivi		
	+	-	
+	a	b	a+b
-	c	d	c+d
	a+c	b+d	n



$Sensibilit\grave{a} = \frac{a}{a+b}$	frazione del totale dei positivi correttamente assegnata nella conta presuntiva
$Specificit\grave{a} = \frac{d}{c+d}$	Frazione del totale dei negativi correttamente assegnata nella conta presuntiva
$\frac{c}{a+c}$	Quota falsi positivi: frazione dei positivi erroneamente assegnati
$\frac{b}{b+d}$	Quota falsi negativi: frazione dei negativi erroneamente assegnati
$Efficienza = \frac{a+d}{n}$	Accuratezza , Frazione delle colonie o dei tubi correttamente assegnati
$Selettivit\grave{a} (F) = \frac{\log(a+c)}{n}$	Rapporto tra il logaritmo dei presunti positivi ed il numero totale delle colonie



VALIDAZIONE METODI QUANTITATIVI

Tre metodi per la validazione primaria dei metodi quantitativi

1. Confronto con un metodo di riferimento, di cui si conoscono le prestazioni

2 - Campioni a valore noto

3. Dati ottenuti con semine in parallelo della stessa diluizioni - ISO 7218/96 - esame della sovradisersione .

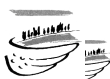


Requisiti per l'adozione e l'utilizzo dei metodi di prova microbiologici

1. Confronto di un metodo con un metodo di riferimento

La sperimentazione avviene replicando n (10) volte la prova in parallelo con i due metodi. Possono essere utilizzati i dati provenienti da un circuito interlaboratorio

Fattore critico: l'analita deve rimanere stabile nel corso dell'allestimento delle prove



Requisiti per l'adozione e l'utilizzo dei metodi di prova microbiologici

La relazione che ci permette di valutare i risultati ottenuti in parallelo con i due metodi è

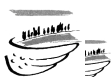
$$\frac{K_p}{\sqrt{n}} \geq \frac{|c_{mA} - c_{mB}|}{\sqrt{c_{mA} + c_{mB}}}$$

ove:

$K_p = 1,96$ ($p=0,95$)

c_{mA} e c_{mB} = media dei valori ottenuti con i due metodi

n = numero delle repliche



Requisiti per l'adozione e l'utilizzo dei metodi di prova microbiologici

Si riporta il seguente esempio (da G.Gellera corso Unichim 24/09/02 - Milano)

Metodo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media
A	38	39	42	46	37	53	39	54	40	39	42,7
B	61	56	40	57	42	57	43	58	56	53	52,3

1- Verifica del grado di accordo dei dati ottenuti con il modello di Poisson

$$\chi_{sp}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (c_i - c_m)^2}{c_m} \leq \chi_{p.v}^2$$

Metodo A

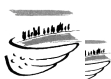
$$\chi_{sp}^2 = \frac{348,1}{42,7} = 8,15$$

Metodo B

$$\chi_{sp}^2 = \frac{524,1}{53,2} = 10,02$$

g.l.=10-1=9

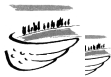
$$\chi_{sp}^2 = 16,92$$



Metodo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Media
A	38	39	42	46	37	53	39	54	40	39	42,7
B	61	56	40	57	42	57	43	58	56	53	52,3

$$\frac{|42,7 - 53,3|}{\sqrt{42,7 + 52,3}} = 0,98 \quad \frac{1,96}{\sqrt{10}} = 0,62$$

I due metodi esaminati forniscono risultati diversi con $p > 0,95$

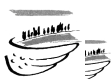


2 - Valore noto dell'analita

La relazione che ci permette di valutare il risultato con il valore noto dell'analita è

$$K_p \geq \frac{|c_m - \mu|}{\sqrt{\frac{c_m}{n} + s_\mu^2}}$$

μ = valore "vero", C_m = valore riscontrato
 $K_p = 1,96$ ($p=0,95$)
 s_μ^2 = Scarto tipo del valore noto
 n = numero delle repliche



Numero totale di campioni da analizzare per verificare l'equivalenza di due metodi di conteggio su piastra

s	D %	L %	C	n. campioni $n = Cs^2$
80	60	30	0,0044	28
	40	20	0,0100	64
	30	15	0,0178	114
	20	10	0,0400	256
	10	5	0,1600	1.024

UNI EN ISO 17994 : Novembre 2004
 Criteri per definire una equivalenza tra metodi microbiologici utilizzabili sulla matrice acqua

Numero totale di campioni da analizzare per verificare l'equivalenza di due metodi di conteggio MPN

m tubi paralleli inoculati per livello	L %	n. campioni $n = \frac{1700}{m}$
3	10	567
5		340
10		170

Numero totale di campioni da analizzare per verificare l'equivalenza di due metodi Presenza/Assenza

Le prove di equivalenza di metodi P/A richiedono un grandissimo numero di campioni. Infatti i campioni dove entrambi i metodi danno lo stesso risultato (++) o (--) non contribuiscono (vengono esclusi) alla valutazione statistica di equivalenza. Il numero di campioni ritenuti sufficiente per rivelare una differenza relativa di L % tra 5 e 40% è riportato in tabella :

L %	n campioni
40	100
30	170
20	380
15	680
10	1.540
5	6.140



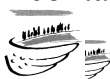
Angelo Viti

Requisiti per l'adozione e l'utilizzo dei metodi di prova microbiologici

3. Dati ottenuti con semine in parallelo della stessa diluizioni,

1 - L'analisi dei dati ottenuti con semine in parallelo consente di verificare le prestazioni del metodo in quanto i dati ottenuti dalle piastre inoculate con la stessa diluizione del campione, permette di valutare l'efficacia del metodo, avendo ridotto al minimo eventuali errori casuali (es. diluizioni o quantità inocolata).

L'analisi statistica diventa molto potente se i dati sono raccolti nel tempo, riguardano più matrici ed il numero delle UFC copre l'intero intervallo (15-300) ----di conta



Angelo Viti

50/64

METODI QUANTITATIVI ELEMENTI DI STATISTICA

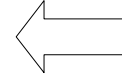
Il modello statistico in grado di descrivere i dati ottenuti dalle conte su piastra è la distribuzione di Poisson.

Media

$$C_m = \frac{\sum C_i}{n}$$

Varianza

$$\sigma^2 = C_m$$



La precisione di un metodo è rappresentata dallo scarto tipo e pertanto la precisione è funzione del numero di germi rilevati

$$s = \sqrt{\sigma^2} = \sqrt{C_m}$$



Lo scarto tipo relativo (RDS) è:

$$RDS = \frac{s}{C_m} = \frac{\sqrt{C_m}}{C_m} = \sqrt{\frac{1}{C_m}}$$



METODIO QUANTITATIVI ELEMENTI DI STATISTICA

C.V. = RDS*100

ISO/TR 13843:2000(E)

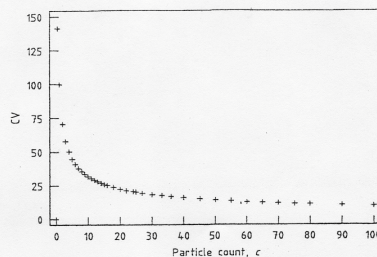


Figure 1 — The coefficient of variation of colony number *c* in a perfectly mixed suspension following the Poisson distribution law



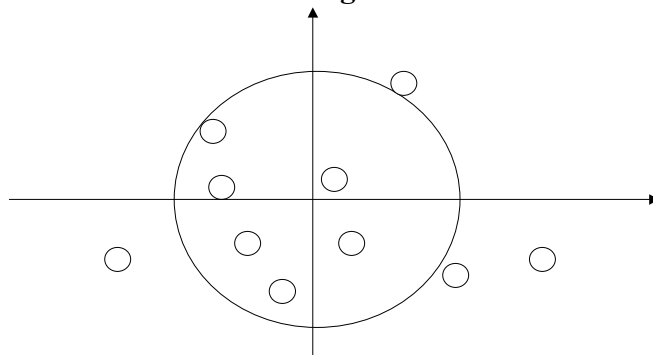
METODIO QUANTITATIVI
ELEMENTI DI STATISTICA

L'esecuzione di una prova comporta la comparsa di errori casuali (modalità di preparazione del campione, misure di volumi e/o masse, temperature di incubazioni, errori di lettura ect....). La somma di tutti gli errori determina una certa dispersione dei risultati, che, detta sovradisersione (overdispersion), si somma alla dispersione dei dati della distribuzione di Poisson



METODO QUANTITATIVI
ELEMENTI DI STATISTICA

Verifica del grado di accordo con il modello



**METODIO QUANTITATIVI
ELEMENTI DI STATISTICA**

Criteria di valutazione della dispersione - Indice di dispersione

(Verifica del grado di accordo con il modello)

$$G_{n-1}^2 = 2 * \left[\sum c_j * \ln c_j - (\sum c_j) * \ln \left(\frac{\sum c_j}{n} \right) \right]$$

g.l.=n-1

n= num. Oss.

La quale può essere approssimata

$$\chi_{sp}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (c_i - c_m)^2}{c_m} \leq \chi_{p,n-1}^2$$

oppure

$$\chi_{n-1}^2 = \frac{n * \sum c_i^2}{\sum c_i} - \sum c_i$$

n= n. di prove

Valutazione

$$G_{n-1}^2 \approx \chi_{sp}^2 = \chi_{n-1}^2 \leq \chi_{g.l.n-1(p \geq 0,95)}^2$$



**METODIO QUANTITATIVI
ELEMENTI DI STATISTICA**

Valutazione della proporzionalità (linearità)

(su più repliche, con più diluizioni)

$$G_{m-1}^2 = 2 * \left[\sum_{i=1}^m \left(c_i \ln \frac{c_i}{R_i} \right) - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right) \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^m c_i}{\sum_{i=1}^m R} \right) \right]$$

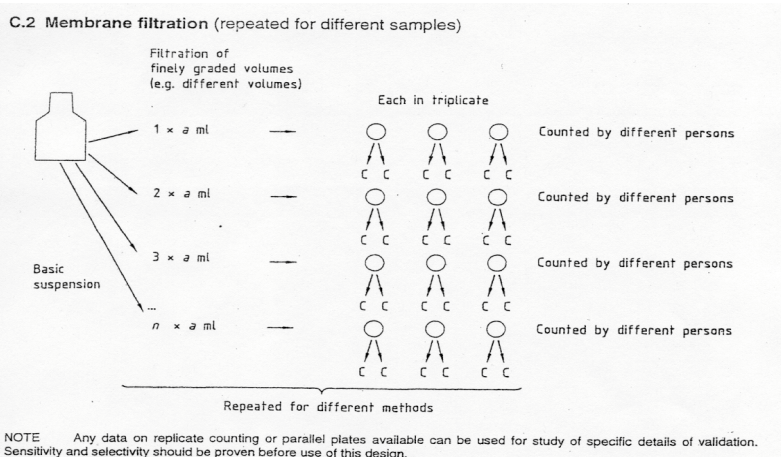
c_i = UFC della esima piastra
 R_i = volume relativo inoculato nella esima piastra
 m = numero di diluizioni esaminate

G.l.= m - 1

I valori calcolati del G^2 sono confrontati con i valori teorici del χ^2



VALIDAZIONE METODI QUANTITATIVI



VALIDAZIONE METODI QUANTITATIVI

**UFC (15-300) rilevate in piastre
con PCA (agar germi 48±3 h a 30±1 °C)**

Prova	Piastra 1	Piastra2	Prova	piastra 1	Piastra 2
1	40	35	21	300	286
2	30	28	22	120	118
3	302	295	23	110	105
4	80	71	24	195	186
5	166	152	25	35	33
6	48	36	26	188	180
7	42	33	27	320	290
8	38	36	28	190	172
9	452	438	29	280	268
10	110	100	30	76	66
11	54	50	31	192	180
12	203	190	32	60	52
13	296	280	33	300	280
14	280	270	34	40	34
15	180	172	35	120	110
16	161	158	36	137	133
17	90	85	37	30	29
18	55	50	38	91	80
19	46	40	39	172	164
20	60	52	40	150	140
21	300	286	41	67	65



VALIDAZIONE METODI QUANTITATIVI

3. Dati ottenuti con semine in parallelo della stessa diluizioni, - ISO 7218/96-

1 - L'analisi dei dati ottenuti con semine in parallelo consente di verificare le prestazioni del metodo in quanto i dati ottenuti dalle piastre inoculate con la stessa diluizione del campione, permette di valutare l'efficacia del metodo, avendo ridotto al minimo eventuali fattori che aumentano la sovradisersione dei dati (es. diluizioni o quantità inocolata).

L'analisi statistica diventa molto potente se i dati sono raccolti nel tempo, riguardano più matrici ed il numero delle UFC copre l'intero intervallo (15-300) di conta



VALIDAZIONE METODI QUANTITATIVI

**UFC (15-300) rilevate in piastre
con PCA (agar germi 48±3 h a 32±1 °C)**

Calcolo indice di dispersione per ciascuna replica

$$\chi^2_{n-1} = 2 \left[\sum (c_i \ln c_i) - \left(\sum c_i \right) \ln \left(\frac{\sum (c_i)}{n} \right) \right]$$

Ove n= numero di piastre esaminate in parallelo

FIL 169:1994



VALIDAZIONE METODI QUANTITATIVI

UFC (15-300) rilevate in piastre con PCA (agar germi 48±3 h a 30±1 °C)

Prova	Piastra 1	Piastra2	G	Prova	piastro 1	Piastra 2	G
1	40	35	0,333581	21	300	286	0,334503
2	30	28	0,068979	22	120	118	0,016807
3	302	295	0,082079	23	110	105	0,11629
4	80	71	0,536742	24	195	186	0,212618
5	166	152	0,616551	25	35	33	0,058832
6	48	36	1,720165	26	188	180	0,173927
7	42	33	1,082607	27	320	290	1,476005
8	38	36	0,054061	28	190	172	0,895397
9	300	265	2,16953	29	280	268	0,262795
10	110	100	0,476371	30	76	66	0,704809
11	54	50	0,153884	31	192	180	0,387164
12	203	190	0,430104	32	60	52	0,571915
13	296	280	0,444502	33	300	280	0,689792
14	280	270	0,181828	34	40	34	0,487021
15	180	172	0,181834	35	120	110	0,43492
16	161	158	0,028214	36	137	133	0,059261
17	90	85	0,142877	37	30	29	0,01695
18	55	50	0,238185	38	91	80	0,708091
19	46	40	0,418945	39	172	164	0,190494
20	60	52	0,571915	40	150	140	0,344896
21	300	286	0,334503	41	67	65	0,030304

P=0,95 G<3,884
g.l. =1



Requisiti per l'adozione e l'utilizzo dei metodi di prova microbiologici



1° tutte le determinazione hanno una dispersione che rientra nei limiti di accettabilità

2° Il valore di $G_A^2 = \sum G^2$ Risulta pari a 18,440

Il confronto con il G teorico con 41-1=40 g.l. per p=0,95 (55,758) indica che la matrice (e anche l'esecuzione delle diluizioni) non influisce sulla sovradisersione.

IL METODO PERTANTO FORNISCE DATI CON UNA SOVRADISPERSIONE CHE NON MODIFICA STATISTICAMENTE QUELLA TEORICA DI POISSON. PERTANTO È IDONEO E I RISULTATI OTTENUTI SONO "AFFIDABILI"



Il rapporto di validazione è trasmesso alla funzione tecnica competente (responsabile laboratorio), il quale, dopo l'approvazione **autorizza o richiede** l'autorizzazione all'alta direzione per la messa in routine del metodo stesso. L'esito positivo è comunicato al cliente.

In caso di esito negativo della validazione e/o di mancata approvazione l'esito viene comunicato al cliente ed il processo si considera chiuso.

L'alta direzione può, per giustificati motivi (strategia aziendale, metodo derivante da norme cogenti, ect.) richiedere che studio di fattibilità sia ripetuto, magari adeguando le risorse o i tempi.



Bibliografia

- UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura
- ISO 7218:1996/Amd 1:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination
- UNI EN ISO 6887/1-2000: Microbiologia di alimenti e mangimi per animali- Preparazione dei campioni di prova, sospensione iniziale e diluizioni decimali per l'analisi microbiologica – Regole generali per la preparazione della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali
- UNI ENV ISO 13843:2003. Qualità dell'acqua - Guida alla validazione dei metodi microbiologici
- UNI 10674/2002. Acque destinate al consumo umano: Guida generale per determinazioni microbiologiche
- UNI EN ISO 16140:2005. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Protocollo per la validazione di metodi alternativi
- N. Bottazzini, L. Cavalli Criteri statistici per il controllo della qualità dei risultati. Seminario UNICHIM " la qualità nei laboratori di microbiologia secondo la UNI CEI ISO/IEC 17025 – Competenza tecnica degli operatori e qualità dei risultati –Milano 24/09/2002
- A. Gellera: Esempi pratici inerenti ai criteri di accettabilità dei risultati delle prove e valutazione capacità operative del personale tecnico Seminario UNICHIM " la qualità nei laboratori di microbiologia secondo la UNI CEI ISO/IEC 17025 – Competenza tecnica degli operatori e qualità dei risultati –Milano 24/09/2002
- European co-operation for Accreditation EA -04/10-2002 Accreditation for microbiological Laboratories
- ISO 14461 IDF 169 Parte 1 e 2 Milk and milk product - quality control in microbiological laboratories

