

L'accreditamento dei laboratori per la sicurezza alimentare

1[^] edizione 2005

25 - 26 ottobre

Validazione dei metodi microbiologici

Angela Maiello

LIMITI DI APPLICABILITÀ

- Peculiarità dell'ambito microbiologico
- Limiti oggettivi di applicazione delle metodologie di validazione diffuse e consolidate in altri settori

UNI ENV ISO 13843:2003 p.to 5.3

“La variazione casuale dovuta alla distribuzione non uniforme delle particelle tra campioni paralleli, persino nelle sospensioni perfettamente miscelate, è una caratteristica dei metodi microbiologici. *La variazione casuale di base è inevitabile e non ha niente a che fare con le competenze tecniche o l'apparecchiatura.* Essa segue una legge matematica nota, la distribuzione di Poisson.

Le imperfezioni tecniche e molte altre cause sono responsabili della variazione addizionale. (...) denominata sovradisersione”

UNI ENV ISO 13843:2003

- p.to 6.2.4

“La sovradisersione è un’utile misura di affidabilità complessiva. Essa può essere rivelata mediante gli indici di dispersione (X^2 , G^2)”

- p.to 6.2.1

“La sovradisersione è lo stato normale delle determinazioni microbiologiche, mentre la distribuzione di Poisson è un’eccezione”

Indice di dispersione di Poisson

(UNI ENV ISO 13843:2003)

$$\bar{c} \geq 15$$

$$(n > 2)$$

Criterio di accettabilità per n prove replicate di uno stesso campione

$$\chi^2_{n-1} = \frac{n \sum c_i^2 - (\sum c_i)^2}{\sum c_i} = \frac{n \sum c_i^2}{\sum c_i} - \sum c_i$$

n = numero di piastre parallele della diluizione *iesima*

Formula equivalente

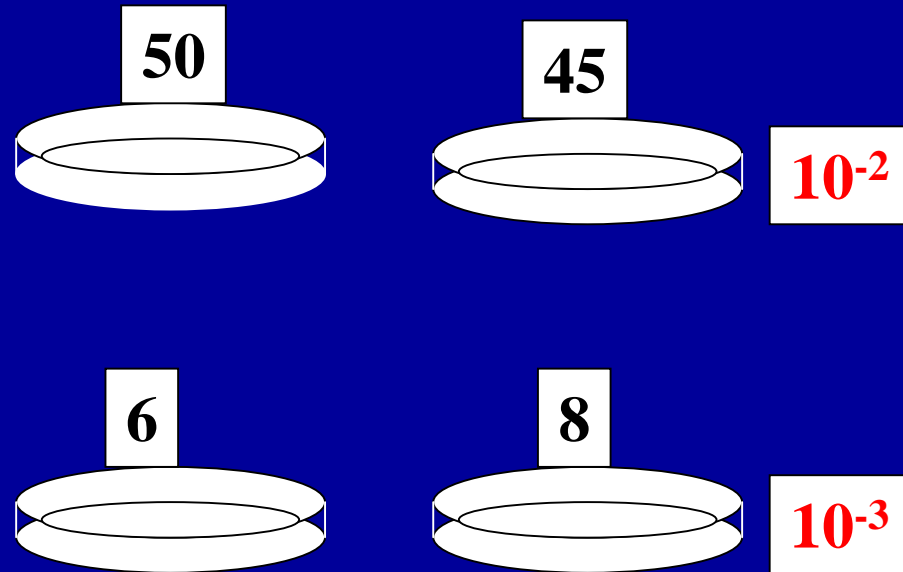
$$\chi^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}{\bar{c}} \leq \chi^2_{p,v}$$

Conte inferiori a 15 ufc/piastra

ISO 7218 - Tabella A.2

Piastra 1 ufc	Piastra 2 ufc	Somma	Media	Limite inferiore	Limite superiore	Qualità risultato
8	16	24	12	8	18	OK
6	18	24	12	8	18	NC
5	19	24	12	8	18	NC

**Valutare l'omogeneità generale della prova:
tra le diluizioni e tra le piastre ripetute**



**Valutare se le variazioni,
rispetto ai dati attesi,
sono più elevate di quelle
dovute al caso**

Proporzionalità dei conteggi

in un sistema rivelatore multiplo

Parametro G^2

Costituisce una stima della varianza relativa che **comprende tutte le componenti casuali dell'incertezza** (distribuzione di Poisson, effetti dell'incertezza dei volumi e l'incertezza di lettura delle conte)

Esprime il grado di proporzionalità dei conteggi in un sistema rivelatore multiplo

Proporzionalità dei conteggi

in un sistema rivelatore multiplo

$$G_{n-1}^2 = 2 \cdot \left[\sum_{i=1}^n z_i \cdot \ln \left(\frac{z_i}{v_i} \right) - Z \cdot \ln \left(\frac{Z}{V} \right) \right]$$

z_i = conta delle colonie nella i -esima capsula di Petri

v_i = volume di sospensione distribuita nella i -esima capsula (in ml)

n = numero di capsule

Z = somma di tutte le conte i -esime

V = somma dei volumi delle i -esime sospensioni

G^2 - SIGNIFICATO

Il valore assunto da G^2 permette di valutare se l'operatore abbia lavorato in maniera accettabile e se i conteggi ottenuti alle distinte diluizioni siano da considerarsi congruenti tra loro

Tale condizione si ottiene se

$$G^2 \leq \chi_{p=0,95} (n-1)$$

G^2 - SIGNIFICATO

- Valore atteso nella classica distribuzione di Poisson

$$G^2/n-1 \leq 1,0$$

- Presenza di variabilità non imputabile alla sola distribuzione di Poisson

$$G^2/n-1 > 1,0$$

- Presenza di problemi analitici

$$G^2/n-1 > 5,0$$

In questo caso i dati dovrebbero essere riesaminati

RIPETIBILITÀ

(UNI ENV ISO 13843:2003)

Prossimità della concordanza tra i risultati di misurazioni successive dello stesso misurando effettuate nelle stesse condizioni di misurazione

La ripetibilità è calcolata come

$$r = 2,8 s_r$$

dove s_r è lo scarto tipo della ripetibilità

Metodi normati e dati di precisione

Metodi quantitativi: ripetibilità / riproducibilità

* ISO 7937:2004 *Clostridium perfringens*

* ISO 7932:2004 *Bacillus cereus*

** ISO 4833:2003 Conteggio colonie a 30°C

* *Su 3 matrici alimentari diverse a 3 [livelli] e con MRC*

** *Solo per latte crudo e pastorizzato*

Metodi normati e dati di precisione

Metodi qualitativi: accordance/concordance

- ISO 11290-1:1996 *L. monocytogenes*

Metodi quantitativi

PRECISIONE

Limite di ripetibilità

- Differenza assoluta tra i risultati di 2 prove indipendenti (valori \log_{10}) o il rapporto tra il più alto ed il più basso dei 2 risultati della prova (valori in scala normale). Prove in condizioni di ripetibilità

Limite di riproducibilità

- Differenza assoluta tra i risultati di 2 prove indipendenti (valori \log_{10}) o il rapporto tra il più alto ed il più basso dei 2 risultati della prova (valori in scala normale), usando stesso metodo, stesso campione ma differenti operatori in differenti laboratori.

Esempio calcolo ripetibilità (ISO 4833:2003)

$r = 0,25$ in \log_{10} di m.o./ml
(pari a rapporto di 1,8 in scala numerica normale)

- Primo risultato: $10^5 = 100.000$
- Secondo risultato:
 - $\geq 10^{4,75} = 56.000$
 - $\leq 10^{5,25} = 178.000$
- Rapporto $178.000/100.000 = 1,78$
- Rapporto $100.000/56.000 = 1,79$

Metodi qualitativi

Accordance /concordance

- **ACCORDANCE**

Probabilità percentuale di trovare lo stesso risultato (positivo o negativo) da 2 identici campioni di prova analizzati in condizioni di ripetibilità

- **CONCORDANCE**

Probabilità percentuale di trovare lo stesso risultato (positivo o negativo) da 2 identici campioni di prova analizzati in 2 laboratori diversi

Prove collaborative ISO 11290-1:2004

Carne macinata	<i>L. monocytogenes</i> Livello di contaminazione		
	Controllo	Basso livello 5-100 cellule	Alto livello 50-100 cellule
ACCORDANCE %	97,3	81,3	100,0
CONCORDANCE %	95,6	71,7	100,0

Prove collaborative

ISO 11290-1:2004

Formaggio fresco	<i>L. monocytogenes</i>		
	Livello di contaminazione		
	Controllo	Basso livello 5-100 cellule	Alto livello 50-100 cellule
ACCORDANCE %	94,4	84,0	100,0
CONCORDANCE %	93,1	75,2	100,0

E per concludere ...

... alcuni spunti di riflessione
anche ai fini della valutazione delle prove

UNI ENV ISO 13843:2003 p.to 4.2.8

“Le prove collaborative sono state sviluppate in uno strumento ampiamente applicato per le prove delle caratteristiche di precisione dei metodi chimici. *Sembra tuttavia prematuro raccomandare lo stesso in microbiologia. (...)*”

“L’esperienza presente è che gli esperimenti collaborativi destinati alle prove delle prestazioni dei metodi tendono a trasformarsi in *prove di perizia del laboratorio ed esercizi di formazione*”

UNI ENV ISO 13843:2003 p.to 5.7

“Le possibilità di controllo dei processi nelle analisi sono limitate. I tipi più comuni sono l’uso di campioni di riferimento per sottoporre a prova la costanza di recupero e le determinazioni duplicate per controllare la precisione (ripetibilità e/o riproducibilità). *Questa pratica si adatta molto ben alle analisi chimiche automatizzate, ma è fuori luogo nelle analisi microbiologiche.*”

UNI ENV ISO 13843:2003 p.to 5.7

... controllo dei processi nelle analisi ...

“Presume che il procedimento analitico dia le prestazioni migliori all’inizio e possa peggiorare improvvisamente o gradualmente, dopo di che tutti i risultati sono in errore. *In microbiologia non è facile indicare quando un metodo è sotto controllo o fuori controllo.* Un risultato analitico di scarsa qualità può non essere correlato ad altri risultati dello stesso giorno.”

UNI ENV ISO 13843:2003 p.to 6.1.2

L'incertezza casuale aumenta rapidamente con la riduzione della conta delle colonie.

Nell'intervallo di *conteggio sotto a dieci* circa, che è di considerevole interesse per la salute pubblica, le singole *misurazioni sono così imprecise che possono essere a malapena caratterizzate come migliori che semi-quantitative.*

UNI ENV ISO 13843:2003 p.to 9.2.1

A causa delle forti influenze dell'operatore e della popolazione microbica, *nessuna delle caratteristiche prestazionali* specificate sopra (sensibilità, specificità, tasso di falsi positivi, tasso di falsi negativi, efficienza) *può avere un valore costante specifico del metodo*

UNI ENV ISO 13843:2003 p.to 9.5.2
Stime della precisione di tipo A

Tali stime non hanno ancora fatto la loro comparsa nelle norme microbiologiche...

“...la precisione delle determinazioni microbiologiche non è costante persino in scala logaritmica, ma dipende dal numero delle colonie”

UNI ENV ISO 13843:2003 p.to 9.5.3

Le enunciazioni di precisione basate sulla distribuzione di Poisson sono molto comuni nelle norme microbiologiche

“... il modello di Poisson ... ha il vantaggio distintivo che *una singola stima può essere collegata a ogni determinazione*”

...anche le norme non sono perfette!

	Pagina	Par.agrafo	Titolo paragrafo o riga	Descrizione e /o proposta soluzione non conformità
NON CONFORMITÀ GRAVE: TRADUZIONE ERRATA				
	4	2.36	Riproducibilità	<i>Definizione errata (la stessa della ripetibilità)</i>
	25	10.2.2	Conteggio dell'incertezza ...	<i>“Conteggio dell'incertezza” anziché “Incertezza di conteggio”</i>
	41	C.1	Conta in piastra ...riga 5	<i>(per esempio, fase 7 diluizioni) anziché “..7 fasi di diluizione”</i>
NON CONFORMITÀ GRAVE: RIFERIMENTO ERRATO già presente nel testo inglese				
	26	11.1	Un modello generale ... (quarta riga)	<i>... (esempio B.1, ...) anziché C.1 errore già della Norma in inglese</i>
	27	11.1	Riga 14	<i>B.1 anziché C.1 errore già della Norma in inglese</i>
	27	11.2	Precisione ...Riga 4	<i>B.2 anziché C.2 errore già della Norma in inglese</i>

...anche le norme non sono perfette!

NON CONFORMITÀ MEDIA: traduzione inadeguata dal punto di vista tecnico

10	5.1	Recupero dell'analista (settima riga)	I rivelatori non possono essere opposti a un numero esattamente noto di germi <i>anziché</i> <i>I rivelatori non possono essere valutati (= messi alla prova) con un numero esattamente noto di germi</i> "cannot be challenged"
11	5.4	Interazioni ... riga 4	"... soffrono dell'affollamento" <i>anziché</i> "... risentono della concentrazione"
20	7	b) Robustezza ... (quarta riga)	"Organismi affaticati" <i>anziché</i> "Organismi stressati"
20	7	c) Limiti ...	"... crescita non coliforme" ... <i>anziché</i> ... "crescita di batteri non coliformi"
20	7	d) Definizione ...	"... gruppo coliforme" <i>anziché</i> "... gruppo dei coliformi"
36	B.7.1	Riga 6	L'incertezza del volume praticamente <u>svanisce</u> tra la dispersione casuale delle particelle <i>anziché</i> <i>L'incertezza del volume praticamente diventa trascurabile rispetto alla dispersione casuale delle particelle</i>

La scienza è fatta di dati come una casa di pietre.
Ma un ammasso di dati non è scienza
più di quanto
un mucchio di pietre sia una casa.

(Jules Henri Poincaré)