

Corso di aggiornamento Laboratori accreditati

Milano, 14 settembre 2006
Roma, 21 settembre 2006

Validazione e verifica delle prestazioni dei metodi microbiologici

Angela Maiello

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 p.to 5.4.5

- *Scopo*: confermare con esame e apporto di evidenze oggettive che i requisiti per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti
- *Campo di applicazione*: metodi non normati; progettati dal laboratorio; normati ma utilizzati fuori dal proprio C.di A.; estensioni e modifiche di metodi normati

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 p.to 5.4.5

Tecniche utilizzabili (una o in combinazione)

- Utilizzo di Materiali di Riferimento (MR/MRC)
- Confronto dei risultati ottenuti con altri metodi
- Confronti interlaboratorio
- Valutazione sistematica dei fattori che influenzano i risultati
- Stima dell'incertezza di misura dei risultati

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 p.to 5.4.5

FASI

- Specifica dei requisiti del metodo
- Controllo che i requisiti siano soddisfatti
- **Dichiarazione relativa alla validità**
- Riesami regolari (verifica che i requisiti continuino ad essere rispettati)

UNI EN ISO 16140:2005

Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali

PROTOCOLLO PER LA VALIDAZIONE DI METODI ALTERNATIVI

UNI EN ISO 16140:2005

- *Scopo*: Definire i principi generali ed il protocollo tecnico per la validazione di metodi alternativi
- *Campo di applicazione*: analisi microbiologiche di alimenti, mangimi per animali, **campioni ambientali e veterinari**

PROTOCOLLO DI VALIDAZIONE

Fase 1. Confronto del metodo alternativo con un metodo di riferimento (metodologia applicabile in un laboratorio con elevate competenze)

Fase 2. Studio interlaboratorio per ciascuno dei due metodi

Le due fasi possono essere condotte in parallelo

PROTOCOLLO DI VALIDAZIONE Metodi Qualitativi

VALUTAZIONE DEI PARAMETRI:

- ACCURATEZZA RELATIVA (grado di corrispondenza tra la risposta ottenuta dal metodo di riferimento e quello alternativo, *SU CAMPIONI IDENTICI*)

PROTOCOLLO DI VALIDAZIONE

Metodi Qualitativi

- SPECIFICITÀ RELATIVA

Capacità del metodo alternativo di individuare l'analita quando è individuato dal metodo di riferimento

- SENSIBILITÀ RELATIVA

Capacità del metodo alternativo di non reperire l'analita quando non è individuato dal metodo di riferimento

CATEGORIE DI ALIMENTO

“Categorie guida” / tipo di prodotto, riferiti in all. B

- **Per patogeni “rilevanti” (all.B.1)**

Es. *Listeria monocytogenes* - *Staphylococcus aureus* -
Salmonella spp. - *Bacillus cereus*

- **Per microorganismi non patogeni (all.B.2)**

Es Conta microbica totale - Lieviti e muffe – Batteri lattici –
Coliformi – *Escherichia coli*

NUMERO di CAMPIONI

- Selezionare all'interno della categoria, la tipologia di alimento, rappresentativo
- Esaminare 20 aliquote per ciascun tipo di alimento, per ENTRAMBI i metodi (riferimento e alternativo)

TOTALE: almeno 60 risultati /categoria di alimento/ da ciascun metodo

TIPOLOGIA DI CAMPIONE

- **NATURALMENTE CONTAMINATO:** preparare il campione secondo il protocollo All. D, della norma
- **ARTIFICIALMENTE CONTAMINATO:** preparare il livello di inculo in modo che una parte dei campioni – MA NON TUTTI – siano individuati come positivi da 1 o entrambi i metodi (riferimento o alternativo), per la stessa tipologia di alimento

Microorganismi *TARGET*

Selezionare **ALMENO 50** colture pure di microorganismi rilevanti (criteri definiti in All.G), caratterizzati biochimicamente, sierologicamente e, *se rilevante*, geneticamente. (30 per Salmonella)

Preferibile una selezione dei microorganismi da alimenti, origine di cui è necessario “tenere traccia”

CEPPI INTERFERENTI

- Selezionare **ALMENO 30** colture pure di microorganismi interferenti con il m.o *target*, da ceppi che naturalmente sono presenti in ciascun alimento individuato per la validazione

LIVELLO DI INOCULO

Inoculo del terreno di crescita, mediante serie di diluizioni della coltura pura. Valutazione effettuata 1 sola volta - NON IN ALIMENTO.

- Microorganismo *target*: da 10 a 100 volte più elevato del livello minimo di rilevazione
- Microorganismo NON *target*: massimo livello di contaminazione atteso, all'interno della categoria di alimento selezionata

Limiti di applicabilità

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

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 massima accettabile 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 massima accettabile 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**

L. monocytogenes

Livello di contaminazione

	Controllo MRC	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**

L. monocytogenes

Livello di contaminazione

	Controllo MRC	Basso livello 5-100 cellule	Alto livello 50-100 cellule
ACCORDANCE %	94,4	84,0	100,0
CONCORDANCE %	93,1	75,2	100,0

ISO 17994:2004

Qualità dell'acqua - Criteri per stabilire l'equivalenza tra metodi microbiologici

ISO 17994:2004

- *Scopo*: definire una procedura di validazione per confronto di 2 metodi per la ricerca o quantificazione dello stesso gruppo o specie target di microorganismi
- *Campo di applicazione*: metodi quantitativi (conta e MPN) e metodi qualitativi (P/A)
- *Il procedimento non si applica a*: confronto diretto tra un metodo quantitativo (conta/MPN) e un metodo qualitativo (P/A)

ISO 17994:2004

Confronto tra 2 metodi analitici microbiologici di cui 1 POTREBBE essere un metodo normato (non necessariamente)

POSSIBILITA': il metodo in esame NON sia QUANTITATIVAMENTE equivalente al metodo di riferimento e che appaia “migliore” del metodo di riferimento

ISO 17994:2004

Condizioni per definire se 2 Metodi sono quantitativamente equivalenti, “NON DIVERSI”

1. Differenza media relativa minima significativa (L) delle 2 conte *confermate* non deve essere significativamente diversa da zero.
2. L (differenza media, MINIMA) = $D/2$
3. $U \leq D$, Deviazione massima accettabile

ISO 17994:2004

Nei test di valutazione, internazionali ed inter-laboratorio, delle “performance” dei metodi

Valore consigliato $D = 10\%$

REQUISITO FONDAMENTALE DI
UNO STUDIO DI EQUIVALENZA

NUMEROSITA' DI CAMPIONI

- Partecipazione di più laboratori
- Diverse aree geografiche
- Studio accettabile solo per tipologia di campione

TIPOLOGIA DI CAMPIONI

IDEALE: CAMPIONI NATURALI

Spesso necessario preparare campioni *ad hoc*

REQUISITI

- *conte basse, diverse da zero*
- *Matrici incluse nello scopo di entrambi i metodi*

MODALITA' di preparazione

- Diluizione
- Miscelazione di diversi tipi di acqua
- Contaminazione con MR/MRC (ultima opzione)

NUMERO DI LABORATORI

STUDI DI EQUIVALENZA INTERLABORATORIO

NUMERO MINIMO SUGGERITO: 6

Coefficiente per determinare il n° di campioni, ad un determinato L ($p=95\%$)

D %	L % ($D/2$)	C % ($4/L^2$)
60	30	0,004 4
40	20	0,010 0
30	15	0,017 8
20	10	0,040 0
10	5	0,160 0

METODI QUANTITATIVI (conta/UFC)
NUMERO DI CAMPIONI

$$n = Cs^2$$

n = numero di campioni

C = coefficiente che dipende da L ($4/L^2$)

S^2 = varianza

METODI QUANTITATIVI (conta/UFC)

<i>D</i> %	<i>L</i> % (<i>D</i> /2)	<i>C</i> % (4/ <i>L</i> ²)	<i>S</i>	<i>n</i> °campioni da analizzare
60	30	0,004 4	80	28
40	20	0,010 0	80	64
30	15	0,017 8	80	114
20	10	0,040 0	80	256
10	5	0,160 0	80	1024

METODI QUANTITATIVI (MPN) NUMERO DI CAMPIONI

$$n = 1\ 700 / m$$

n = numero di campioni

m = numero di tubi paralleli (3 oppure 5) per diluizione

Es: Per L(%)=10 $1\ 700 / 5 = 340$ *campioni !*

METODI QUALITATIVI (P/A)

*Richiesto un numero
molto elevato di campioni*

!! ATTENZIONE !!

***Campioni che danno lo stesso risultato
(+ / +) o (- / -) non contribuiscono alla
valutazione statistica di equivalenza***

METODI QUALITATIVI (P/A)

n° di campioni, ad un determinato $L\%$ ($p=95\%$)

$L\%$ ($D/2$)	n
40	100
30	170
20	380
15	680
10	1 540
5	6 150

n = numero totale di campioni con risultati DIVERSI (+ -) e (- +)

METODI DIVERSI (UFC - P/A)

NUMERO DI CAMPIONI

Conta e metodi qualitativi NON sono confrontabili

Limiti:

- *Fa perdere “valore” ai risultati di conta*
- *Sovrastima il metodo di P/A*

Causa:

- *Si ignora il valore di conta: sostituzione con (+ presenza), ma SOLO DOPO CONFERME*

n°campioni: come da comparazione di metodi P/A

METODI DIVERSI (P/A - MPN)

NUMERO DI CAMPIONI

Metodologia

- *suddivisione del campione P/A in piccoli volumi → trasformazione in MPN a singola diluizione (es 100ml in 10 aliquote da 10 ml oppure 20 aliquote da 5 ml)*

Limiti

- *Sovrastima il metodo di P/A*

Vantaggi

- *Valutazione della componente “formulazione terreno” e “condizioni di incubazione” – Caratteristiche fondamentali di un metodo microbiologico*

n°campioni: come da comparazione di metodi MPN

VERIFICA DI UN METODO

Requisiti minimi

***Se i DATI sono reperibili dal
Rapporto di uno studio comparativo***

$$n = 4 \left(\frac{s}{y} \right)^2$$

n = numero di campioni richiesti per la valutazione

S = scarto tipo della differenza relativa

y = valore maggiore tra

$$y_1 = \bar{X}$$

$$y_2 = |\bar{X}| - |D|$$

\bar{X} = media aritmetica della differenza relativa, in %

D = devianza max ammessa di U da zero, in %, nel caso di metodi "non diversi"

VERIFICA DI UN METODO

Requisiti minimi

IN ASSENZA di DATI di riferimento

- ***Metodi quantitativi (UFC ed MPN)***

DOPPIO del numero di campioni richiesto a ciascun laboratorio (nel caso di uno studio comparativo)

- ***Metodi qualitativi (P/A)***

ALMENO 400 campioni con risultati (+ -) e (- +)

CONTA e CONFERMA

***≥75% dei campioni DEVE avere
conta diversa da zero***

RAPPORTO DI VALIDAZIONE CONTENUTO

- RIFERIMENTO alla norma applicata (es.ISO 17994:2004)
- **Descrizione CHIARA** (o riferimento) dei metodi messi a confronto
- **Dettagli rilevanti dello studio:** n° campioni; partecipanti; valore di D ...
- **Valutazione finale** con utilizzo della stessa terminologia della norma
- **Differenza media relativa**
- Scarto tipo della differenza relativa
- **ALLEGATI i dati grezzi**

ISO / TS 19036:2006

Microbiologia degli alimenti

Linea Guida per la stima dell'incertezza di misura per le determinazioni quantitative

ISO / TS 19036:2006

Scopo: Stima ed espressione dell'incertezza di misura associata a risultati quantitativi in microbiologia alimenti

Campo di Applicazione

- Prodotti destinati al consumo umano ed animale
- Campioni ambientali (aree di produzione e manipolazione alimenti)

ISO / TS 19036:2006

NON APPLICABILE

- Prove in MPN
- Prove quantitative con bassa concentrazione di m.o. ($UFC < 10$) → ISO 7218
- Prove QUALITATIVE

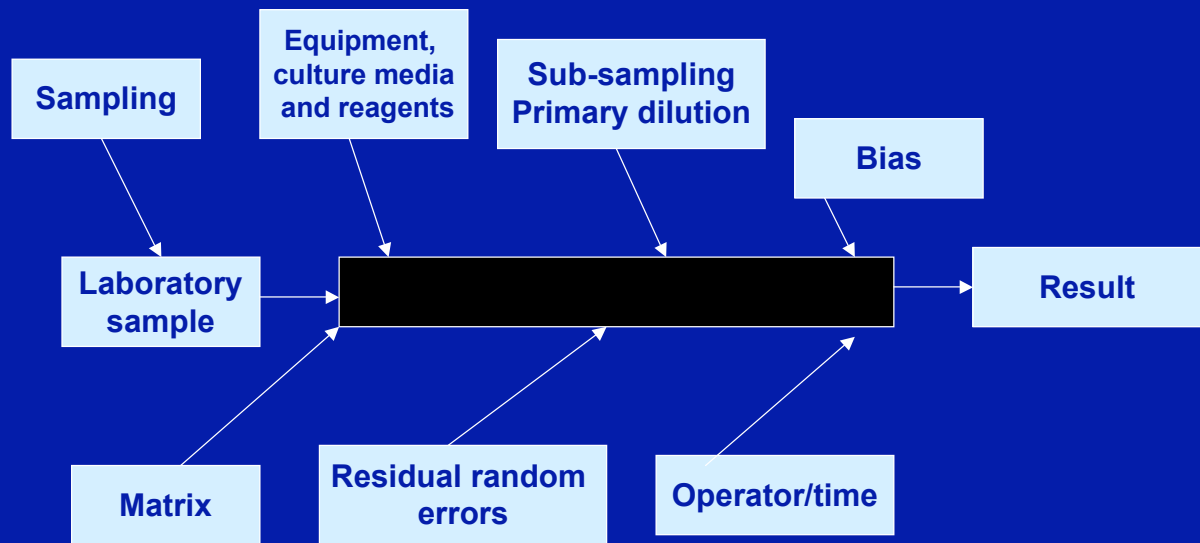
ISO / TS 19036:2006

“Approccio Globale”

Principio:

- risultati sperimentali da replica della stessa prova
- calcolo dello scarto tipo di riproducibilità (s_R) del risultato finale di una misurazione

Fonti di incertezza in microbiologia



SCARTO TIPO DI RIPRODUCIBILITA' (s_R)

1^{th} - s_R intralaboratorio, scarto tipo di precisione intermedia (ISO 5725-3)

2^{nd} - s_R di un metodo (dati da studi interlaboratorio)

3^{rd} - s_R da *proficiency trial*, interlaboratorio

SCARTO TIPO DI RIPRODUCIBILITA' (s_R)

$$U = 2 u_c(y) = 2 s_R$$

U = *incertezza estesa*

2 = *fattore di copertura K ; $p=95\%$*

$u_c(y)$ = *incertezza tipo composta*

SCARTO TIPO DI RIPRODUCIBILITA' (s_R)

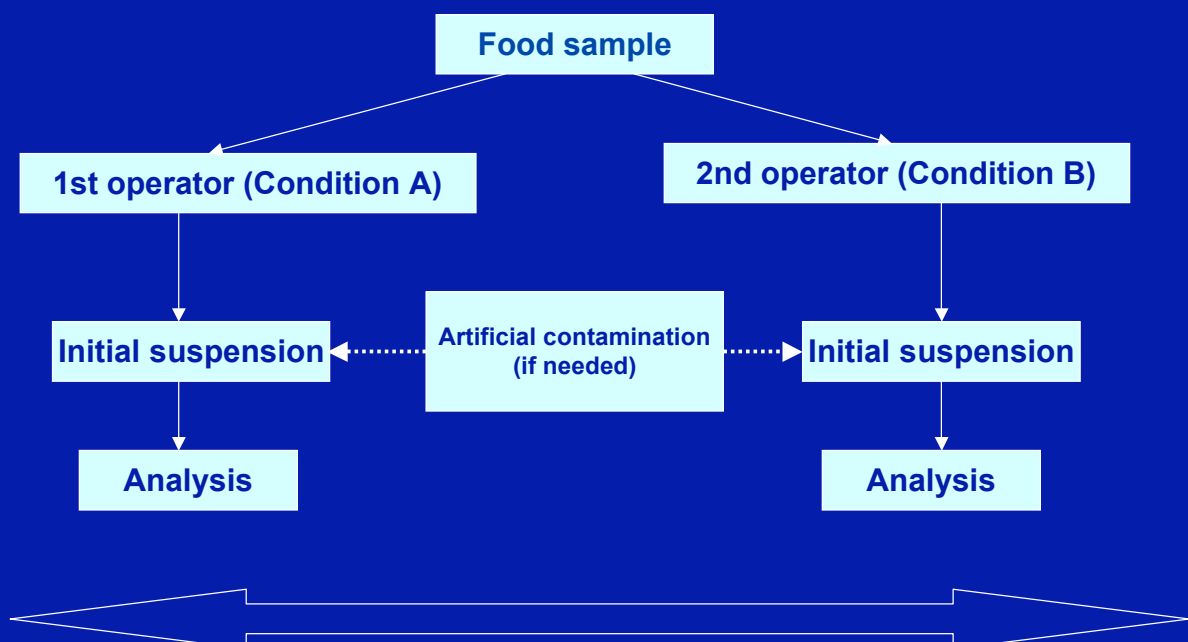
QUANDO CALCOLARLO?

- Per ciascun tipo di m.o. *target* (o gruppi)
- Per ciascuna matrice (o gruppi)
- Per ciascun metodo

U - UGUALE PER TUTTI?

- E' caratteristica di un laboratorio
- E' correlata ad un dato ottenuto in specifiche condizioni (operatori, apparecchiature, reagenti...)
- Non è caratteristica di un metodo analitico di per sé, **indipendentemente** dal laboratorio che la calcola
- Deve essere almeno $U \geq U_{\text{Poisson}}$

Protocollo sperimentale



s_R DI UN METODO valutazione INTRALABORATORIO

Effetti valutati /protocollo

- Matrice (realmente contaminate /m.o. stressati)
- Sottocampione (utilizzato per prelevare la porzione per test)
- 10 campioni / ciascuna matrice (quali di routine?)
- Diversi giorni
- Trasformazione log dei dati (stabilizzazione della varianza di riproducibilità / livelli di contaminazione (<10 ufc escluse!))

s_R INTRALABORATORIO

$$s_R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (\log a_i - \log b_i)^2}{2n}}$$

a_i e b_i = primo e secondo risultato della prova sullo stesso campione
($\log a_i - \log b_i$) = differenza tra i 2 risultati, espressi in logaritmo decimale
 n = numero di prove eseguite in doppio (≥ 10)

$i = 1, 2, \dots, n$

s_R INTRALABORATORIO

Table 1 — Calculations of standard deviations of reproducibility — Example of enumeration of aerobic mesophilic flora in mixed poultry meat

i	x_{iA}	x_{iB}	$y_{iA} = \log_{10}(x_{iA})$	$y_{iB} = \log_{10}(x_{iB})$	$\frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}$
1	$6,7 \times 10^4$	$8,7 \times 10^4$	4,83	4,94	0,006 4
2	$7,1 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6$	6,85	6,79	0,001 7
3	$3,5 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	5,54	5,64	0,004 9
4	$1,0 \times 10^7$	$4,3 \times 10^6$	7,00	6,63	0,067 2
5	$1,9 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	7,28	7,23	0,001 2
6	$2,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	5,36	5,18	0,017 2
7	$5,3 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	8,72	8,61	0,006 2
8	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	4,00	4,08	0,003 1
9	$3,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	4,48	4,11	0,065 9
10	$1,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	8,04	8,34	0,045 3

s_R DI UN METODO da studio INTERLABORATORIO

Scopo: **VALIDAZIONE** di un METODO

- Scarto tipo di riproducibilità utilizzata per calcolare l' U del metodo
- Scarto tipo di riproducibilità è legata al metodo e non al laboratorio

s_R DI UN METODO
da studio INTERLABORATORIO

LIMITI

Pochi metodi normati riferiscono dati di R

- ISO 7932 (*B.cereus*)
- ISO 7937 (*C.perfringens*)
- ISO 6888 parte 1 e 2 (S.coagulasi positivo)

**!! NON è POSSIBILE GENERALIZZARE
I DATI DI PRECISIONE !!**