

# Corso di aggiornamento Laboratori accreditati

*Milano, 14 settembre 2006*

*Roma, 21 settembre 2006*

*Abilitazione e mantenimento della qualifica  
degli operatori  
in ambito microbiologico*

*Angela Maiello*

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 p.to 5.2

La Direzione deve assicurare la competenza di coloro che eseguono prove e/o tarature, valutano i risultati e firmano i R.di P...*omissis*...

Il personale deve essere qualificato sulla base di appropriata formazione ed addestramento, esperienza e/o comprovata abilità...*omissis*...

Deve essere valutata l'efficacia delle azioni di formazione ed addestramento.

# CALCOLO DEL CONTEGGIO

(formula della ISO 7218)

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Si riportano di seguito i dati ottenuti da esercitazioni preliminari al Corso di formazione sull'incertezza di misura ai fini della valutazione del grado di accordo tra i laboratori partecipanti, nel calcolo ed espressione del risultato (dati forniti: serie di conte a 2 diluizioni consecutive)

## DATI CONTE

*Test di valutazione preliminare al "Corso Incertezza"*

Prima diluizione ( $10^{-3}$ )		Seconda diluizione ( $10^{-4}$ )	
Piastra 1 n. colonie	Piastra 2 n. colonie	Piastra 1 n. colonie	Piastra 2 n. colonie
250	-	25	-
230	-	40	-
260	-	15	-
220	-	50	-
200	250	50	40
260	240	28	22

# RISULTATI

*Dati espressi dai partecipanti al test di valutazione*

Partecipante	Conteggio 1	Conteggio 2	Conteggio 3	Conteggio 4	Conteggio 5	Conteggio 6	ERRORI
A	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	OK
B	$2,5 \times 10^5$	$3,15 \times 10^5$	$2,05 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	$3,37 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	calcolo arrotond.
C	$275 \times 10^{-3}$	$270 \times 10^{-3}$	$275 \times 10^{-3}$	$270 \times 10^{-3}$	$270 \times 10^{-3}$	$275 \times 10^{-3}$	calcolo arrotond.
D	$2,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	esponente arrotond.
E	$2,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	esponente arrotond.
F	250.000	245.000	250.000	245.000	245.000	245.000	arrotond.
G	250.000	245.000	250.000	250.000	250.000	250.000	arrotond.
H	250.000	250.000	250.000	250.000	250.000	250.000	OK
I	250.000	320.000	200.000	140.000	320.000	250.000	calcolo
L	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	OK
M	$2,5 \text{ e}+5$	$2,45 \text{ e}+5$	$2,5 \text{ e}+5$	$2,45 \text{ e}+5$	$2,45 \text{ e}+5$	$2,5 \text{ e}+5$	arrotond.
N	$250 \times 10^3$	$245 \times 10^3$	$274 \times 10^3$	$245 \times 10^3$	245.000	$250 \times 10^3$	calcolo arrotond.
O	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	esponente
P	250.000	315.000	205.000	360.000	337.500	250.000	calcolo arrotond.
Q	250.000	315.000	205.000	360.000	337.500	250.000	calcolo arrotond.

## Valutazione dei dati

*( campione di partecipanti esaminato)*

VALORE CORRETTO: 250.000 ( $2,5 \times 10^5$ )

**Risultati NON CONFORMI: 68%**

### Risultati estremi

- Valore MINIMO: 140.000 ( $1,4 \times 10^5$ )
- Valore MASSIMO: 2.500.000 ( $2,5 \times 10^6$ )

ISO 14461-1:2005 IDF 169-1:2005

Latte e derivati del latte  
Controllo di qualità nei laboratori di  
Microbiologia

*“Valutazione della performance degli operatori  
che effettuano il conteggio delle colonie”*

ISO 14461-1:2005 IDF 169-1:2005

**Scopo**

- Valutare la variabilità intralaboratorio nella tecnica di conta delle colonie
- Identificare le fasi associate ad una elevata variabilità
- Valutazione della applicazione delle GLP (prerequisito)

**Campo di applicazione**

- Metodi quantitativi (conteggio colonie).
- Matrice elettiva latte e derivati

# ISO 14461-1:2005 IDF 169-1:2005

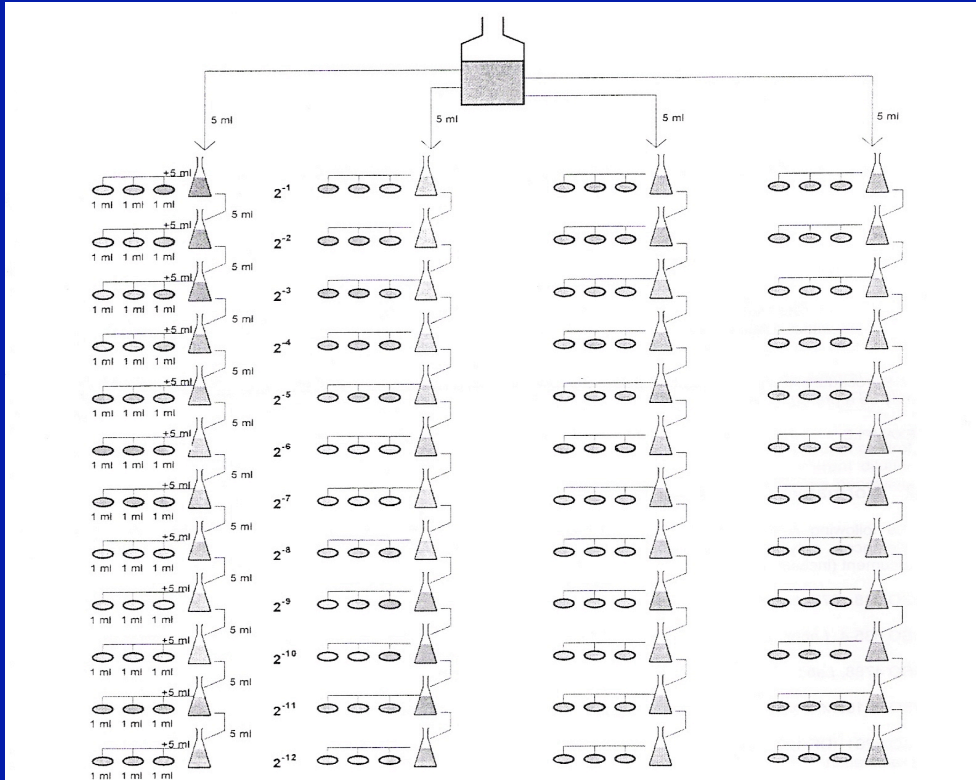


Figure 1 — Quality assurance in the microbiological laboratory:  
Design of pilot studies for plate count

# ISO 14461-1:2005 IDF 169-1:2005

## PROCEDURA

- 1 o più operatori (compiti specifici)
- Concentrazione di lavoro: 500 ÷ 10 000 UFC/ml
- 4 serie di diluizioni parallele
- 12 fasi di diluizione BINARIA (1:2)
- 3 piastre parallele / serie / diluizione (144 piastre)
- Incubazione
- Randomizzazione delle serie
- Conta delle colonie

## ISO 14461-1:2005 IDF 169-1:2005

### !! AVVERTENZE !!

- Scegliere reagenti ed acqua di *grado analitico*
- Utilizzare terreni di coltura di “*qualità batteriologica*”
- Preparare terreni e diluenti secondo *specifiche rigorose*
- Scegliere /preparare ed *utilizzare correttamente* vetreria e materiale monouso
- Frazionare il diluente *prima della sterilizzazione*
- Sterilizzare in *unica fase* (per terreno; per materiale)

## ISO 14461-1:2005 IDF 169-1:2005

### !! AVVERTENZE !!

- Accurata *miscelazione del campione* (25volte, no schiuma)
- Accurata preparazione della “*porzione test*”  
(miscelazione manuale di 300mm per 25 volte; meccanica per  $8s \pm 3s$ )
- Accurata preparazione delle *diluizioni* (ISO 8261/IDF 122)
- Utilizzo terreno di coltura alla temperatura di  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$
- Utilizzo terreno di coltura *entro 2 ore* dalla preparazione

ISO 14461-1:2005 IDF 169-1:2005

## !! AVVERTENZE !!

- Incubare numero massimo di **3 piastre/colonna**
- Contrassegnare la posizione delle piastre relativamente alla colonna (**basso-medio-alto**)
- Separare le colonne tra loro e staccarle dalle pareti
- Togliere qualsiasi “contenitore extra”, dall'incubatore

ISO 14461-1:2005 IDF 169-1:2005

## VALUTAZIONE STATISTICA

- Tabulazione delle conte / Randomizzazione
- Conta delle colonie
- Valutazione omogeneità della conta

# Randomizzazione delle conte

	S1		S2		S3		S4	
2 <sup>-1</sup>	Piastra 1	129	Piastra 1	2	Piastra 1	82	Piastra 1	96
	Piastra 2	29	Piastra 2	21	Piastra 2	105	Piastra 2	46
	Piastra 3	143	Piastra 3	80	Piastra 3	6	Piastra 3	35
2 <sup>-2</sup>	Piastra 1	140	Piastra 1	130	Piastra 1	124	Piastra 1	122
	Piastra 2	100	Piastra 2	65	Piastra 2	135	Piastra 2	45
	Piastra 3	93	Piastra 3	88	Piastra 3	107	Piastra 3	87
2 <sup>-3</sup>	Piastra 1	127	Piastra 1	117	Piastra 1	115	Piastra 1	106
	Piastra 2	108	Piastra 2	138	Piastra 2	18	Piastra 2	20
	Piastra 3	89	Piastra 3	10	Piastra 3	63	Piastra 3	75
2 <sup>-4</sup>	Piastra 1	50	Piastra 1	123	Piastra 1	49	Piastra 1	61
	Piastra 2	17	Piastra 2	97	Piastra 2	72	Piastra 2	99
	Piastra 3	32	Piastra 3	104	Piastra 3	26	Piastra 3	128
2 <sup>-5</sup>	Piastra 1	52	Piastra 1	13	Piastra 1	64	Piastra 1	5
	Piastra 2	22	Piastra 2	14	Piastra 2	40	Piastra 2	34
	Piastra 3	134	Piastra 3	25	Piastra 3	37	Piastra 3	70
2 <sup>-6</sup>	Piastra 1	69	Piastra 1	113	Piastra 1	11	Piastra 1	1
	Piastra 2	136	Piastra 2	109	Piastra 2	48	Piastra 2	78
	Piastra 3	95	Piastra 3	31	Piastra 3	19	Piastra 3	28
2 <sup>-7</sup>	Piastra 1	4	Piastra 1	74	Piastra 1	59	Piastra 1	57
	Piastra 2	79	Piastra 2	67	Piastra 2	39	Piastra 2	71
	Piastra 3	73	Piastra 3	51	Piastra 3	141	Piastra 3	23
2 <sup>-8</sup>	Piastra 1	92	Piastra 1	12	Piastra 1	55	Piastra 1	62
	Piastra 2	30	Piastra 2	66	Piastra 2	133	Piastra 2	81
	Piastra 3	27	Piastra 3	131	Piastra 3	91	Piastra 3	121
2 <sup>-9</sup>	Piastra 1	101	Piastra 1	144	Piastra 1	15	Piastra 1	58
	Piastra 2	36	Piastra 2	98	Piastra 2	116	Piastra 2	24
	Piastra 3	16	Piastra 3	83	Piastra 3	56	Piastra 3	47
2 <sup>-10</sup>	Piastra 1	68	Piastra 1	94	Piastra 1	120	Piastra 1	142
	Piastra 2	43	Piastra 2	38	Piastra 2	119	Piastra 2	132
	Piastra 3	90	Piastra 3	41	Piastra 3	85	Piastra 3	33
2 <sup>-11</sup>	Piastra 1	125	Piastra 1	139	Piastra 1	137	Piastra 1	111
	Piastra 2	114	Piastra 2	126	Piastra 2	53	Piastra 2	8
	Piastra 3	54	Piastra 3	9	Piastra 3	76	Piastra 3	86
2 <sup>-12</sup>	Piastra 1	102	Piastra 1	42	Piastra 1	3	Piastra 1	103
	Piastra 2	77	Piastra 2	44	Piastra 2	110	Piastra 2	7
	Piastra 3	84	Piastra 3	112	Piastra 3	118	Piastra 3	30

# Conta delle colonie

Piastra	Numero di colonie	Piastra	Numero di colonie	Piastra	Numero di colonie	Piastra	Numero di colonie
1		37		73		109	
2		38		74		110	
3		39		75		111	
4		40		76		112	
5		41		77		113	
6		42		78		114	
7		43		79		115	
8		44		80		116	
9		45		81		117	
10		46		82		118	
11		47		83		119	
12		48		84		120	
13		49		85		121	
14		50		86		122	
15		51		87		123	
16		52		88		124	
17		53		89		125	
18		54		90		126	
19		55		91		127	
20		56		92		128	
21		57		93		129	
22		58		94		130	
23		59		95		131	
24		60		96		132	
25		61		97		133	
26		62		98		134	
27		63		99		135	
28		64		100		136	
29		65		101		137	
30		66		102		138	
31		67		103		139	
32		68		104		140	
33		69		105		141	
34		70		106		142	
35		71		107		143	
36		72		108		144	



# VALUTAZIONE STATISTICA

## PREREQUISITI

- $\geq 5$  livelli di diluizione **binaria, consecutivi devono essere contabili**
- Concentrazione accettabile ( **$5 \div 300$** ) ufc/piastra

# VALUTAZIONE STATISTICA

## **!! CRITICITA' !!**

3 piastre/diluizione, non contabili  $\longrightarrow$   
Scarto anche delle altre 3 serie / stessa diluizione

***MASSIMO 5% DELLE PIASTRE  
PUO' ESSERE ESCLUSO***

## Omogeneità delle piastre replicate (test - $G_P^2$ )

$$G_P^2 = 2 \cdot \left[ \sum_i^s \sum_j^d \sum_k^p \left( C_{ijk} \cdot \ln \frac{C_{ijk}}{C_{ij}} \right) \right]$$

$p$  = n° delle piastre

$s$  = n° serie di diluizioni

$d$  = n° steps di diluizioni

$C_{ijk}$  = Valore di ciascuna piastra

$C_{ij}$  = Valore medio di tre piastre parallele

$$C_{ijk} \cdot \ln \frac{C_{ijk}}{C_{ij}} = \text{Valore da calcolare per ciascuna piastra}$$

## Omogeneità globale delle conte (test - $G_A^2$ )

Calcolare per ciascun set di piastre parallele

$$G_{(2)}^2 = 2 \left[ \sum_k^p \left( C_{ijk} \cdot \ln \frac{C_{ijk}}{E(C_{ijk})} \right) \right]$$

Sommare i valori ottenuti da tutte le serie e tutte le diluizioni

$$G_A^2 = \sum_i^s \sum_j^d G_{(2)}^2$$

# Omogeneità globale delle conte (test - $G_A^2$ )

Confrontare i valori di  $G_A^2$  con valori di  $\chi^2$  tabulati ( $p = 0,01$ )

gdl	$\chi^2_{0.01}$	gdl	$\chi^2_{0.01}$
56	83.53	67	96.82
57	84.75	68	98.02
58	85.96	69	99.22
59	87.17	70	100.42
		71	101.62

ISO 14461-1:2005(E)  
IDF 169-1:2005(E)

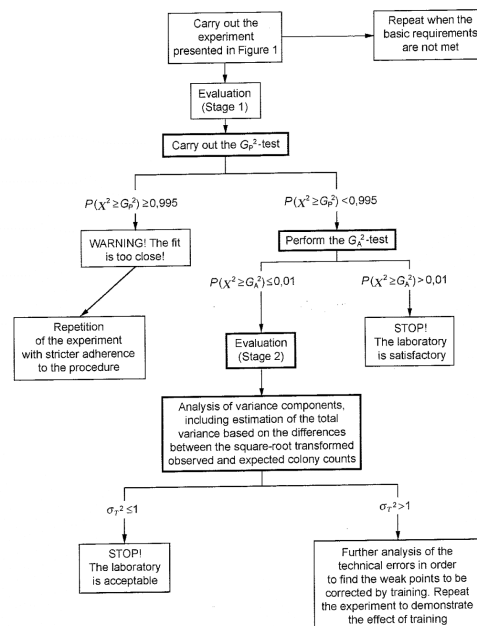


Figure 2 — Flow diagram of the statistical analysis of a laboratory performance study of the plate count

## $G_A^2$ maggiore del $\chi^2$ ( $p=0,01$ ) INTERPRETAZIONE

$G_A^2$  —————> **SEGNALE DI ATTENZIONE**

fasi del metodo con una MODERATA maggiore variabilità rispetto a quello che ci aspetterebbe se il metodo fosse applicato correttamente

$G_A^2$  —————> **APPLICAZIONE INADEGUATA DEL METODO**

fasi (uno o più) del metodo con una ELEVATA variabilità rispetto all'atteso. Necessario indagare e correggere. Analisi della Varianza

## ANALISI della VARIANZA

### SORGENTI DI VARIAZIONE

- Tra serie (s) di diluizioni Varianza  $\sigma_s^2$
- Tra diluizioni (d) per ciascuna serie Varianza  $\sigma_d^2$
- Tra piastre parallele (p) Varianza  $\sigma_p^2$

**Varianza totale**  $\sigma_T^2 = \sigma_p^2 + \sigma_d^2 + \sigma_s^2$

**Se:**  $\sigma_p^2 \approx 0,25$  e  $\sigma_T^2 \leq 1$  metodo statisticamente “sotto controllo”

**Se:**  $\sigma_T^2 > 1$  Uno o più fattori è “fuori controllo” —————> indagine per individuare i “punti deboli” nella applicazione del metodo

# APPLICAZIONE

- **$G^2$  per valutazione capacità analitica operatori**  
——→ carta di controllo per operatore (dopo il *training*) anche con prove di *routine* ——→  
Monitoraggio operatori
- **$\geq 10$  valori di  $G^2$**  ——→ carta di controllo per  
valutazione “*performance*” del metodo ——→  
validazione del metodo

ISO 14461-2:2005    IDF 169-2:2005

Latte e derivati del latte  
Controllo di qualità nei  
laboratori di Microbiologia

*Valutazione della affidabilità del conteggio delle  
colonie in piastre parallele e delle diluizioni decimali*

# ISO 14461-2:2005 IDF 169-2:2005

## *Scopo*

- Valutare i risultati della enumerazione dei m.o. mediante la tecnica di conta delle colonie
- Valutare la capacità di effettuare le diluizioni

## *Campo di applicazione*

- Metodi quantitativi (conteggio colonie)
- Metodi con fasi di diluizione in base 10 e semina su 1 o 2 piastre parallele per ciascuna diluizione

*Applicazione delle GLP (prerequisito)*

# ISO 14461-2:2005 IDF 169-2:2005

## **!! FREQUENZA DI APPLICAZIONE !!**

- Se metodo già prevede la semina su 2 piastre: **verifica ad ogni prova**
- Se il metodo prevede la semina su 1 piastra: **verifica in doppio, ogni 100 campioni** (*proposta*)

ISO 14461-2:2005 IDF 169-2:2005

## VALUTAZIONE DATI

Confronto dei valori con i dati riportati in Tabella 1  
per valutare conte di **piastre parallele**

**Conformità valutata con Probabilità (P) 99%**

- Conta per piastra
- Somma delle 2 conte
- Limite inferiore e superiore dell'intervallo di fiducia

ISO 14461-2:2005 IDF 169-2:2005

## VALUTAZIONE DATI

Confronto dei valori con i dati riportati in Tabella 2  
per valutare **conte di 2 diluizioni**

**Conformità valutata con Probabilità (P) 99%**

- Somma della conta delle colonie su 2 piastre parallele *oppure*
- Conta delle colonie da 1 piastra per *step* di diluizione, confrontati 2 *step* consecutivi di diluizione in base 10
- Limite inferiore e superiore dell'intervallo di fiducia

# ISO 14461-2:2005 IDF 169-2:2005

## SUPERAMENTO LIMITI: valutazione

- Problemi tecnici allestimento piastre parallele
- Problemi allestimento diluizioni
- **Procedura non attendibile (limiti superati in più di 1/100 casi) → necessaria una verifica della applicazione del metodo**

## UNI 10674:2002

## UNI ENV ISO 13843:2003

Criterio di accettabilità per  $n$  prove replicate di uno stesso campione per  $\bar{c} \geq 15$

Per  $n = 2$

$$\frac{|c_1 - c_2|}{\sqrt{c_1 + c_2}} \leq k_p$$

equivalenti

$$\frac{(c_1 - c_2)^2}{c_1 + c_2} \leq \chi_{p,v=1}^2$$



# UNI ENV ISO 13843:2003

## Guida per la validazione di metodi microbiologici

Criterio di accettabilità per  $n$  prove replicate di uno stesso campione per  $\bar{c} \geq 15$

Per  $n > 2$

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

$n$  = 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

## $G^2$ - SIGNIFICATO

Il valore assunto da  $G^2$  permette di valutare (*di routine*) 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

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

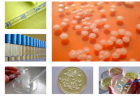
- Presenza di variabilità non imputabile alla sola distribuzione di Poisson

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

- Presenza di problemi analitici

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

In questo caso i dati dovrebbero essere riesaminati



# Calcolo Incertezza

## Metodo semplificato

Metodo che non richiede il calcolo delle singole componenti di incertezza, ma che tiene conto delle componenti date da

- distribuzione di Poisson
- incertezza dei volumi di inoculo
- incertezza di lettura delle piastre

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

Il metodo semplificato permette di valutare l'incertezza relativa che **include tutte le componenti casuali che influenzano le conte in un sistema rivelatore multiplo**

*Diverse combinazioni di conta di colonie  
Medesimo conteggio microbico per unità di campione*

Diluizioni				Risultato (UFC)	$\frac{G_{n-1}^2}{n-1}$	Incertezza estesa $U$	Limite inferiore	Limite superiore
$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$					
249	248	23	24	$2,5 \times 10^7$	0,05	$\pm 510.000$	$2,4 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$
240	244	33	27	$2,5 \times 10^7$	0,99	$\pm 2.100.000$	$2,3 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$
204	280	28	32	$2,5 \times 10^7$	4,86	$\pm 4.700.000$	$2,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
184	300	22	38	$2,5 \times 10^7$	11,57	$\pm 7.300.000$	$1,8 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$

**Mediante calcolo secondo ISO 7218  
nei diversi casi si sarebbe ottenuto lo stesso intervallo di fiducia**

# Efficacia del metodo semplificato

- Il metodo semplificato di calcolo dell'incertezza di misura, a differenza della ISO 7218, esprime valori di incertezza con **ampiezza che è funzione della qualità della prestazione analitica** che ha prodotto il risultato

...e se qualcosa “va male”?

...le cause possono anche prescindere dall'operatore...dipende dalle situazioni e dalla frequenza di comparsa di valutazioni di accettabilità della prova, **NON CONFORMI**.

E' importante ed utile, per intervenire con eventuali AC e/o preventive, **TENERE** traccia delle valutazioni fatte **per ciascuna prova/ correlata all'operatore/ metodi quantitativi** (dati anche non disaggregati per metodo)

## 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.*