

*ISO 7218:2007 e ISO/TS 19036*  
*Un nuovo approccio di calcolo*  
*dell'incertezza di misura*

Corso di Aggiornamento SINAL  
Milano, 16 e 17 ottobre 2008  
Roma, 23 e 24 ottobre 2008

*Angela Maiello*

# ISO 7218:2007

## MICROBIOLOGY OF FOOD AND ANIMAL FEEDING STUFFS – GENERAL REQUIREMENTS AND GUIDANCE FOR MICROBIOLOGICAL EXAMINATION

**Scopo e Campo di applicazione** - Guida per i laboratori di microbiologia - Applicabile ad alimenti e mangimi, all'ambiente di produzione e manipolazione degli alimenti.

Descrive i requisiti tecnici in accordo  
all'Annex B della ISO/IEC 17025:2005

# ISO 7218:2007

§ 10.3 - Calcolo ed espressione dei risultati ottenuti su terreni solidi – conta delle colonie

**Campo di misura: 10 ÷ 300 colonie/piastra**  
*(o secondo le indicazioni del metodo)*

- Colonie totali
- Colonie tipiche
- Colonie presuntive

## §10.3.2.1.2 ISO 7218:2007

*Caso generale* del metodo di calcolo del risultato è applicabile ai casi che possono presentarsi con maggiore frequenza, quando le prove sono condotte in laboratori che operano secondo le buone pratiche.

*Casi speciali* del metodo di calcolo del risultato possono presentarsi occasionalmente ed i risultati valutati da microbiologi esperti e, se del caso, rifiutati.

# Metodo di calcolo – Caso generale

*Conta delle colonie totali o colonie tipiche*

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

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

**ISO 7218:1996**

*n* piastre per diluizione  
2 successive diluizioni  
Almeno 1 piastra contenga  
**15** colonie

**ISO 7218:2007**

**1** piastra per diluizione  
2 successive diluizioni  
Almeno 1 piastra contenga  
**10** colonie

# ISO 7218:1996 e 2007

*Numero di microorganismi dopo identificazione*

*a = numero colonie dopo identificazione*

$$a = \frac{b}{A} \cdot C$$

*b* = numero colonie confermate

*A* = numero colonie sottoposte a conferma

*C* = numero colonie presuntive contate

A = generalmente 5 colonie da ciascuna piastra sottoposta a conteggio

# Metodo di calcolo

## Dopo identificazione

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

$$N = \frac{\sum a}{V \times 1,1 \times d}$$

### *ISO 7218:1996*

*n piastre per diluizione  
2 successive diluizioni  
Almeno 1 piastra contenga  
15 colonie*

### *ISO 7218:2007*

*1 piastra per diluizione  
2 successive diluizioni  
Almeno 1 piastra contenga  
10 colonie*

# N° di piastre per diluizione ISO 7218:2007 par. 10.2.2

## **Una piastra per almeno due diluizioni**

1. per laboratori che operano “*under quality assurance*” in accordo con i principi della ISO 17025

## **Due piastre**

1. Laboratori “non ISO 17025”
2. Se richiesta una sola diluizione

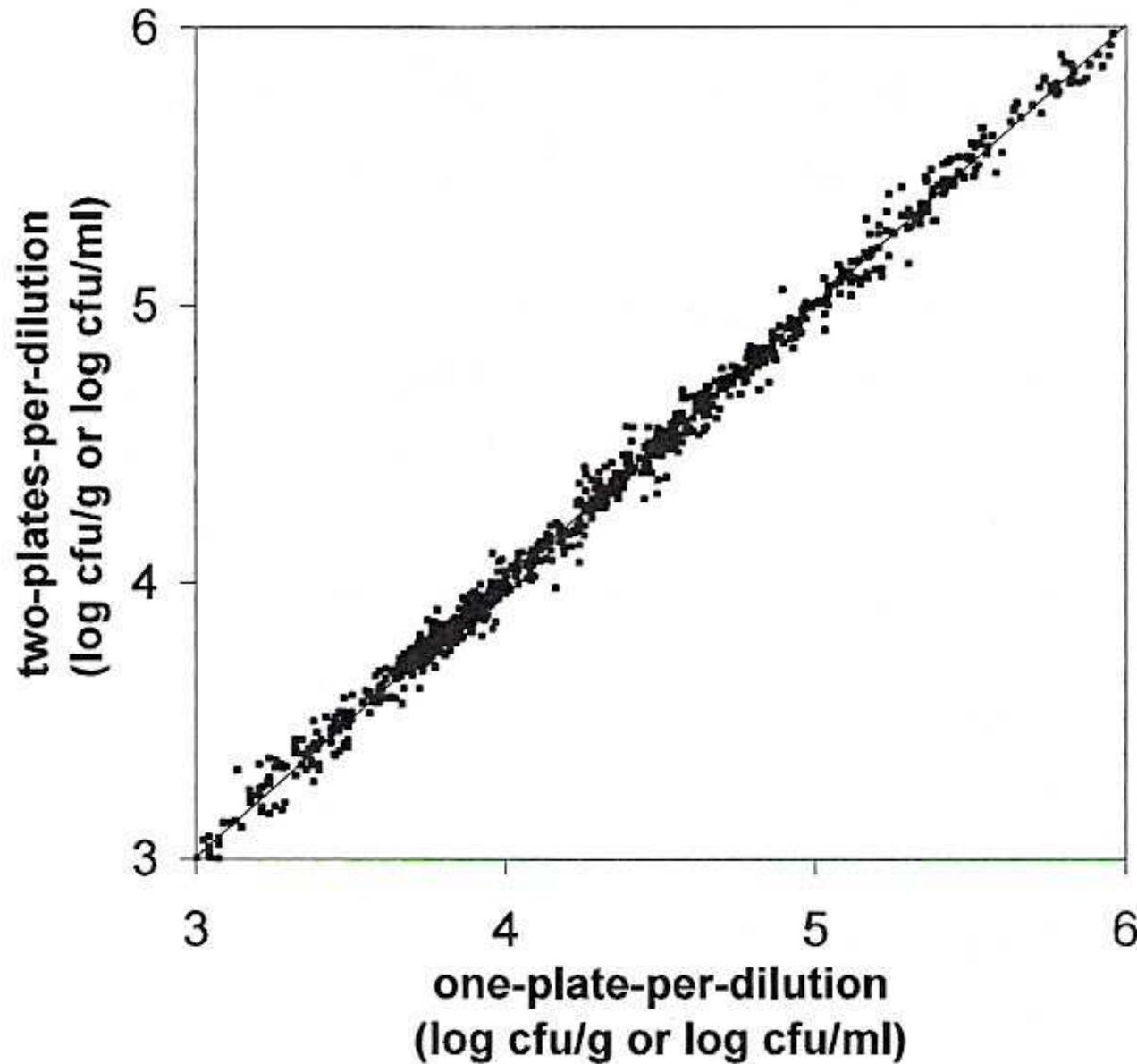
SUPPORTING DOCUMENT ON THE CHANGE  
FROM TWO TO ONE PLATE PER DILUTION  
FOR COLONY-COUNT TECHNIQUES

*Revision of ISO 7218 – June 2007*

AFNOR

ISO/TC 34/SC 9

“Food products Microbiology”



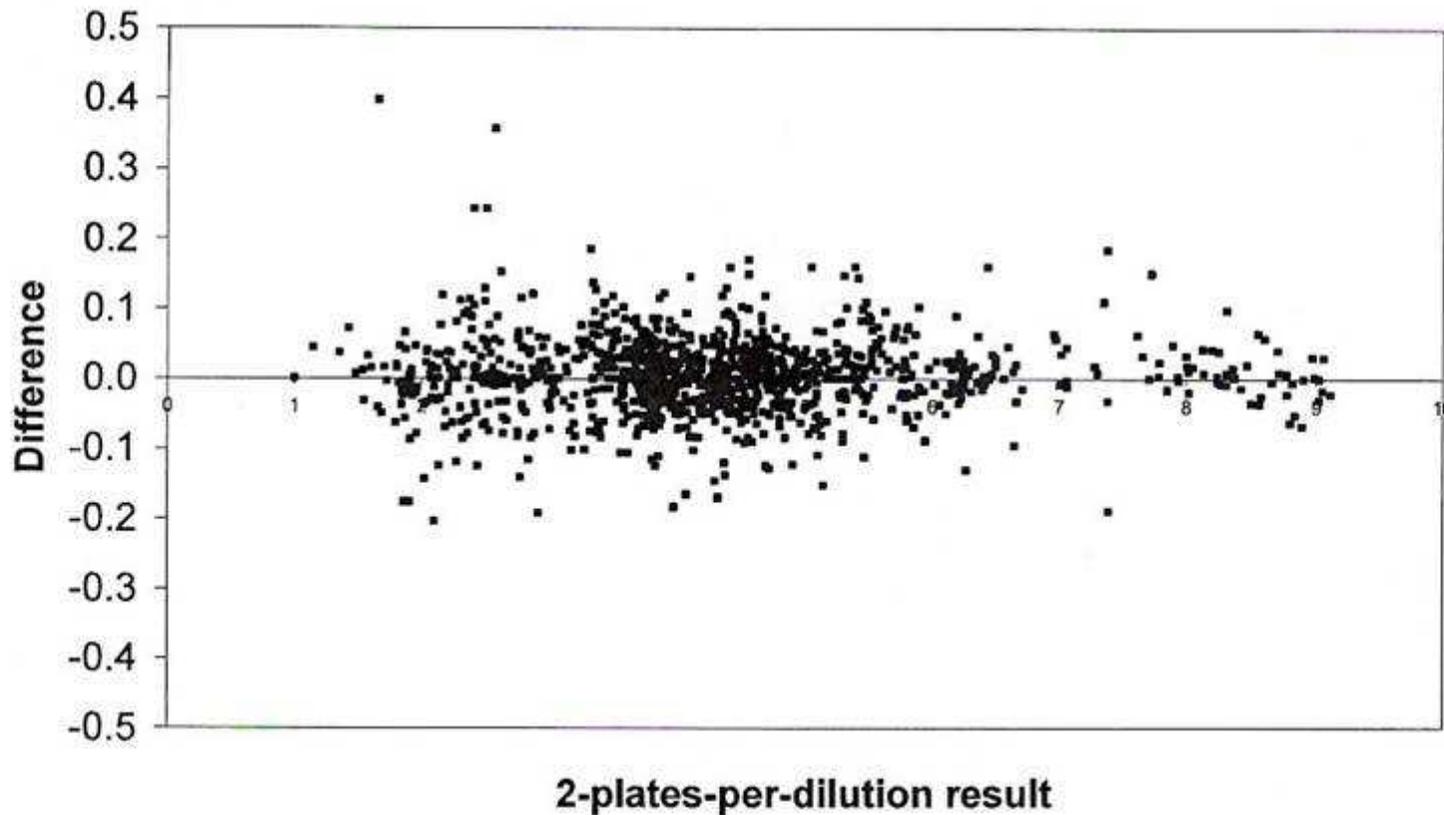
$$r = + 0,9993$$

$$\text{Pendenza} \cong 1$$

$$\text{Intercetta} \cong 0$$

94% dei casi: differenza risultato tra i 2 metodi  $< 0,1$  log

In pari modo negativa e positiva (assenza di bias)

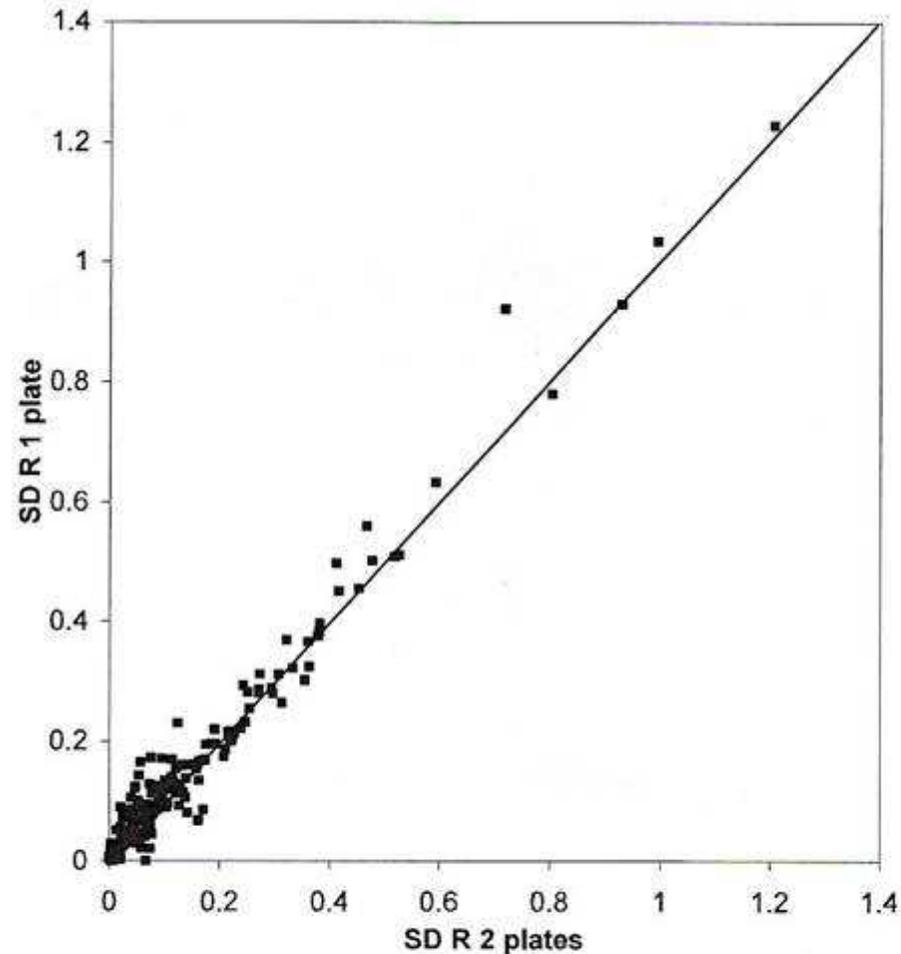


**Figure 4.** Comparison of one-plate versus two-plates-per-dilution methods on 1253 results, using a Bland-Altman plot.

## Scarto tipo di riproducibilità - confronto

Due piastre  
per diluizione  
0,22 log

Una piastra  
per diluizione  
0,23 log



**Figure 5 Comparison of 197 reproducibility experiments:** reproducibility standard deviations of the "one-plate-per-dilution" method *versus* the reproducibility standard deviations of the "two-plates-per-dilution" method. The line shows the equality  $SD R_{2 \text{ plates}} = SD R_{1 \text{ plate}}$ .

# Relazione ISO 7218 e metodi normati

- ISO 7218:2007 *Par. 1 Scope*

*... The requirements of this International Standard supersede the corresponding ones of existing specific standards.*

## §10.3.2.4 ISO 7218:2007

### Metodo di calcolo – Basse conte

Principio base: **Limite di determinazione**  
(in accordo alla UNI ENV ISO 13843:2003)

“ Concentrazione media minima delle particelle  
( $x$ ) per porzione analitica, in cui  
l’incertezza tipo relativa attesa è  
uguale ad un valore definito di RSD ( $w$ )”

## §10.3.2.4 ISO 7218:2007

### Metodo di calcolo – Basse conte

$$w = \frac{s}{\bar{x}}$$

*w = deviazione standard relativa (RSD) – scarto tipo relativo*

*s = stima della deviazione standard (scarto tipo del campione)*

$\bar{x}$  = *media (del campione)*

## §10.3.2.4 ISO 7218:2007

### Metodo di calcolo – Basse conte

Nel caso della distribuzione di Poisson, la minor concentrazione di particelle  $x$ , quantificabile, è data da

$$x = \frac{1}{(w)^2}$$

## §10.3.2.4 ISO 7218:2007

### Metodo di calcolo – Basse conte

Se il limite dello scarto tipo relativo  $w$  scelto = 50%, il limite minimo di quantificazione è dato da

$$x = \frac{1}{(0,50)^2} = 4$$

$$x = \frac{1}{0,25} = 4$$

$w = 50\%$  - ragionevole in microbiologia  
(cfr errore % su Tab 1 e 2 Annex A - ISO 7218: 1996)

## §10.3.2.4.1 ISO 7218:2007

### Metodo di calcolo – Basse conte

#### Conta delle colonie tra 1 e 3

“Microorganismi presenti, ma meno di  $4 \times 1/d$  per *g* o *ml*”

*Attenzione alla simbologia della ISO 7218:2007*

#### Conta delle colonie tra 4 e 10

“Numero stimato di microorganismi”

*(applicazione formula generale)*

## §10.3.2.4.3.2 ISO 7218:2007

### Indicazioni errate

#### 10.3.2.4.3.2 Case 1

If the number of typical and atypical colonies for the dish containing a first dilution  $d_1$  is greater than 300 (or any other number stated in the specific standard), with visible typical colonies or identified colonies, and if, the dish containing the subsequent dilution  $d_2$  contains less than 300 colonies (or any other number stated in the specific standard), and no typical or identified colony is present, report the result as follows:

“less than  $1/d_2$  and more than  $1/d_1$  microorganisms per millilitre” (liquid products) or “less than  $1/d_2$  and more than  $1/d_1$  microorganisms per gram” (other products)

where  $d_1$  and  $d_2$  are the dilution factors corresponding to the dilution  $d_1$  and  $d_2$ .

EXAMPLE Counting has produced the following results:

- at the first dilution retained ( $10^{-2}$ ): more than 300 colonies on the dish, with typical or identified colonies present;
- at the second dilution retained ( $10^{-3}$ ): 33 colonies, with no typical or identified colonies present.

The result, expressed in microorganisms, is less than 1 000 and more than 100 per millilitre or per gram of product.

# ISO 7218:2007

## Espressione dei risultati

**Arrotondare il risultato a 2 cifre significative**

SE la 3<sup>a</sup> cifra  $< 5$ : non modificare la 2<sup>a</sup> cifra

SE la 3<sup>a</sup> cifra  $\geq 5$ : aumentare la 2<sup>a</sup> cifra di una unità

**Esprimere preferibilmente il risultato come un numero compreso tra 1,0 e 9,9**

# DA NON DIMENTICARE

Al paragrafo 10.3.1 si afferma:

“I differenti metodi di calcolo definiti in 10.3.2 dovrebbero tener conto delle **piastre contenenti 0 (zero) colonie**, se queste piastre sono state prese in considerazione.”

# ESEMPI APPLICATIVI

ESEMPI	I diluizione	II diluizione	CHE FARE?
1°	230	20	Applica la formula generale utilizzando i dati di conta di entrambe le piastre
2°	20	3	
3°	10	2	
<b>4°</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	

# CASI PARTICOLARI

## UNA PIASTRA PER DILUIZIONE (range 10-300)

Quando il range entro il quale devono essere accettate le piastre è compreso tra 10 e 300, bisogna, prima di rigettare le piastre a causa di numeri al di fuori del range, verificare se comunque tali valori si trovano all'interno **dell'intervallo di Fiducia (I.F.): 8 – 334**.



# CASI PARTICOLARI

I diluizione	II diluizione	CHE FARE?
334	30	Applica la formula generale utilizzando i dati di conta di entrambe le piastre
310	8	

**Qualche considerazione sulla proporzionalità delle diluizioni ...**

# CASI PARTICOLARI

I diluizione	II diluizione	CHE FARE?
>334	9	Considera solo la conta della II diluizione esprimendo il risultato come “UFC <b>stimate</b> /g-ml”
> 334	7	<b>Risultato della conta inaccettabile</b>

# CASI PARTICOLARI

## UNA PIASTRA PER DILUIZIONE (range 10-150)

Quando il range entro il quale devono essere accettate le piastre è compreso tra 10 e 150, bisogna, prima di rigettare le piastre a causa di numeri al di fuori del range, verificare se comunque tali valori si trovano all'interno dell'intervallo di Fiducia (I.F.): 7 – 167.



# Intervalli di fiducia (formula ISO 7218:1996)

1a diluizione Piastra 1	1a diluizione Piastra 2	2a diluizione Piastra 1	2a diluizione Piastra 2	Conteggio UFC/g-ml	Limite inferiore UFC/g-ml ISO 7218	Limite superiore UFC/g-ml ISO 7218
150	150	15	15	150	135	167
150		15		150	129	175
10	10	1	1	10	7	15
10		1		10	6	18

# CASI PARTICOLARI

I diluizione	II diluizione	CHE FARE?
>167	7	Considera solo la conta della II diluizione esprimendo il risultato come “UFC <b>stimate</b> /g-ml”

# CASI PARTICOLARI

I Diluizione $10^{-2}$	II Diluizione $10^{-3}$	CHE FARE?
>300	>300	Esprimi il risultato come “superiore a 300.000 UFC/g-ml”
>150	>150	Esprimi il risultato come “superiore a 150.000 UFC/g-ml”

# CASI PARTICOLARI

## COLONIE TIPICHE E CONFERMATE

I Diluizione $10^{-2}$	II Diluizione $10^{-3}$	CHE FARE?
<p>&gt; 300 (<b>presenza</b> di colonie tipiche o confermate)</p>	<p>33 (<b>assenza</b> di colonie tipiche o confermate)</p>	<p>Esprimi il risultato come “inferiore a <math>10^3</math> e superiore a <math>10^2</math> UFC/g-ml” (tra 100 e 1.000 UFC/g-ml)</p>
<p>&gt; 300 (<b>assenza</b> di colonie tipiche o confermate)</p>	<p>33 (<b>assenza</b> di colonie tipiche o confermate)</p>	<p>Esprimi il risultato come “inferiore a <math>10^3</math> UFC/g-ml”</p>

# CASI PARTICOLARI

I diluizione	II diluizione	CHE FARE?
9	1	Applica formula generale utilizzando i dati di conta di entrambe le piastre, esprimendo il risultato come “UFC <b>stimate</b> /g-ml”
4	0	

# CASI PARTICOLARI

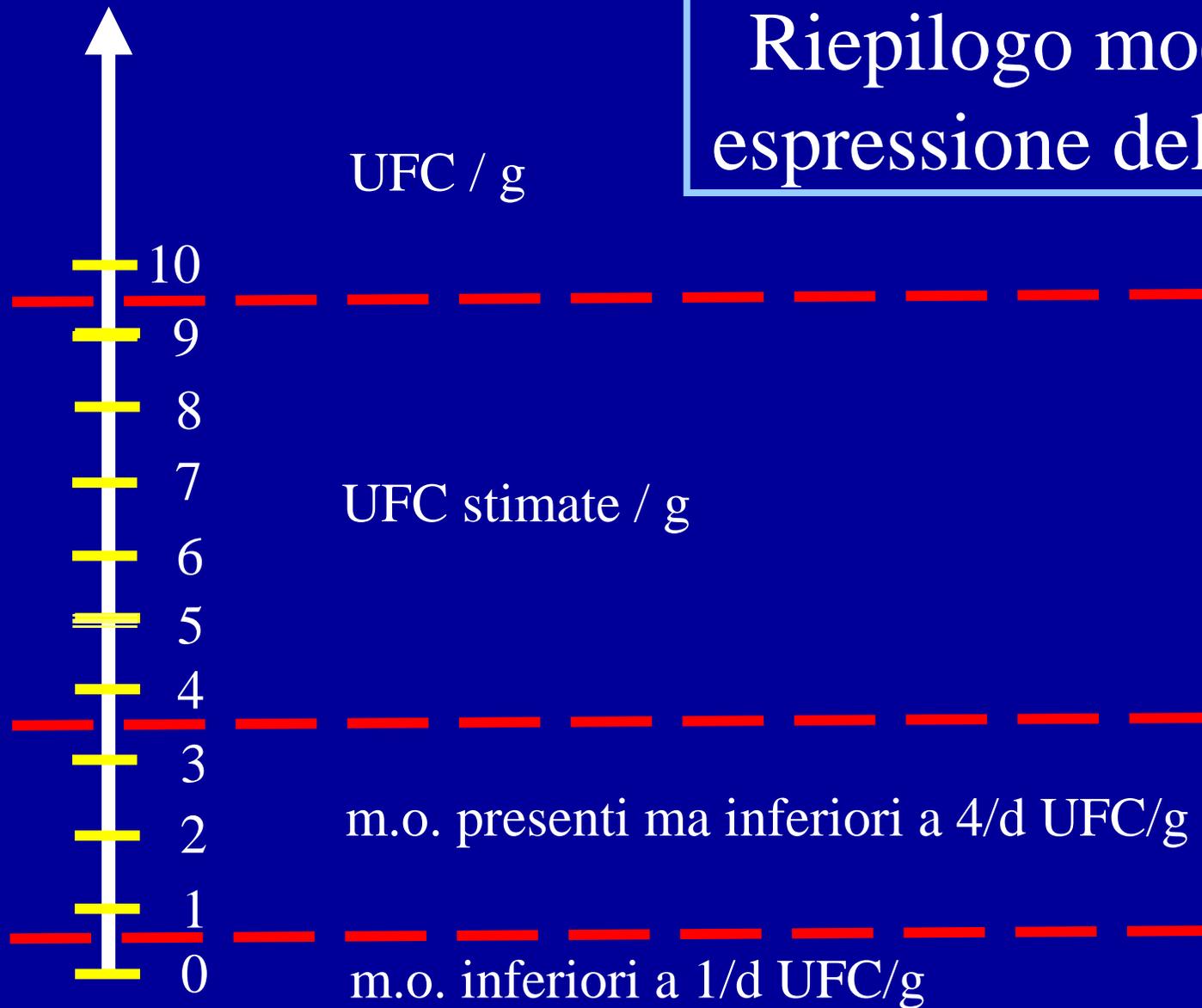
I diluizione	II diluizione	CHE FARE?
3	0	Esprimi il risultato come “inferiore a $4 \times (1/d)$ UFC/g-ml”
2	0	
1	0	

**! Attenzione !**  $d = \text{diluizione}$  Es. 0,1 o 0,01

# CASI PARTICOLARI

I diluizione	II diluizione	CHE FARE?
0	0	Esprimi il risultato come “inferiore a 1/d UFC/g-ml”

# Riepilogo modalità di espressione del risultato



# CASI PARTICOLARI

## CONTEGGIO DI LIEVITI E MUFFE

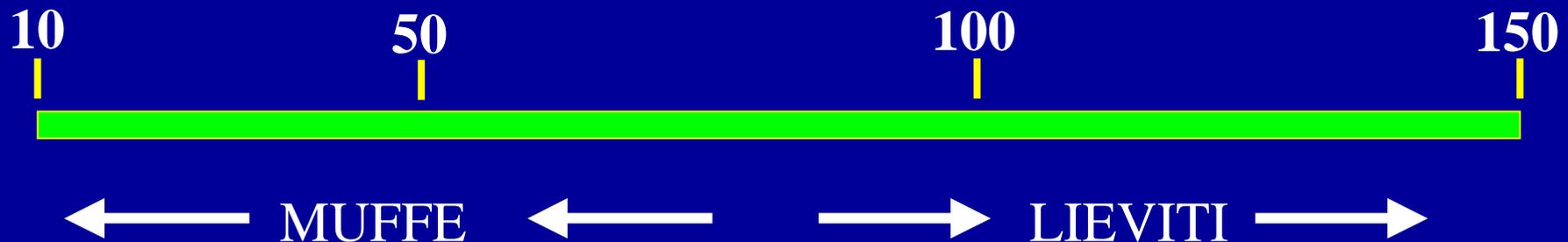
### Criteria di scelta delle piastre

Conteggio prioritario LIEVITI:

scegliere le piastre con n. di colonie più vicino al limite massimo di 150 colonie/piastra.

Conteggio prioritario MUFFE:

scegliere le piastre con n. di colonie più vicino al limite minimo di 10 colonie/piastra.



# ISO / TS 19036:2006

Microbiologia degli alimenti

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

# ISO / TS 19036:2006

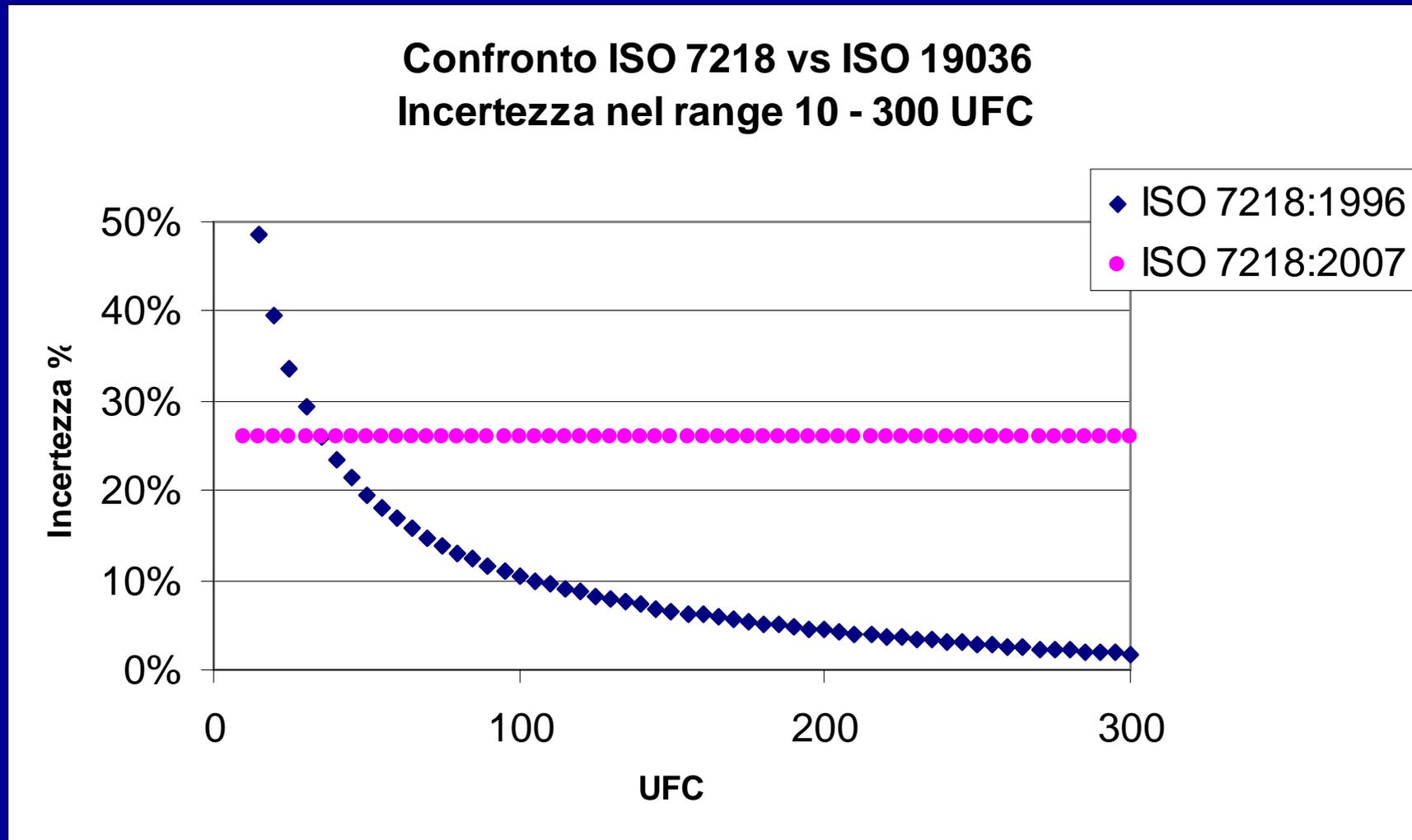
## Campo di Applicazione

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

## NON APPLICABILE

- Prove in MPN
- Prove quantitative con bassa concentrazione di m.o. (UFC<10)  
rif alla ISO 7218 → elaborazione di Amd a ISO 19036
- Prove QUALITATIVE → elaborazione di un nuovo documento

# Differenza più evidente dell'approccio ISO/TS 19036 vs ISO 7218:1996



# SCARTO TIPO DI RIPRODUCIBILITA' ( $s_R$ )

## Modalità di Calcolo

*in ordine di preferenza*

1<sup>th</sup> -  $s_R$  intralaboratorio (Riproducibilità **intralaboratorio**)

2<sup>th</sup> -  $s_R$  di un metodo (dati di validazione interlaboratorio)

3<sup>th</sup> -  $s_R$  da *proficiency trial*, interlaboratorio

## SCARTO TIPO DI RIPRODUCIBILITA' ( $s_R$ )

$$U = 2 u_c(\mathbf{y}) = 2 s_R$$

$U$  = *incertezza estesa*

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

$u_c(\mathbf{y})$  = *incertezza 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

# Problema: quali matrici?

## Secondo criteri di tipo fisico

### **Categoria I**

- Liquidi e polveri (es. latte, latte di cocco, acqua, latte essiccato, caseinati, cipolle in polvere)

### **Categoria II**

- Solidi ben miscelati (es. carne macinata, carne separata meccanicamente, salumi, *crushed meat*, panna montata, gelato al latte, crema di soia, ecc.)

# Problema: quali matrici?

## Secondo criteri di tipo fisico

### **Categoria III**

- Solidi di piccola taglia (es. prezzemolo/funghi essiccati, carote e sedano rapa grattugiati, tagliolini secchi, insalata IV gamma, gamberetti, cozze, cereali, mangimi, nocciole tritate)

### **Categoria IV**

- Altri solidi (carni non tritate, formaggi, prodotti di pasticceria, pesce, piatti pronti, prosciutto,)

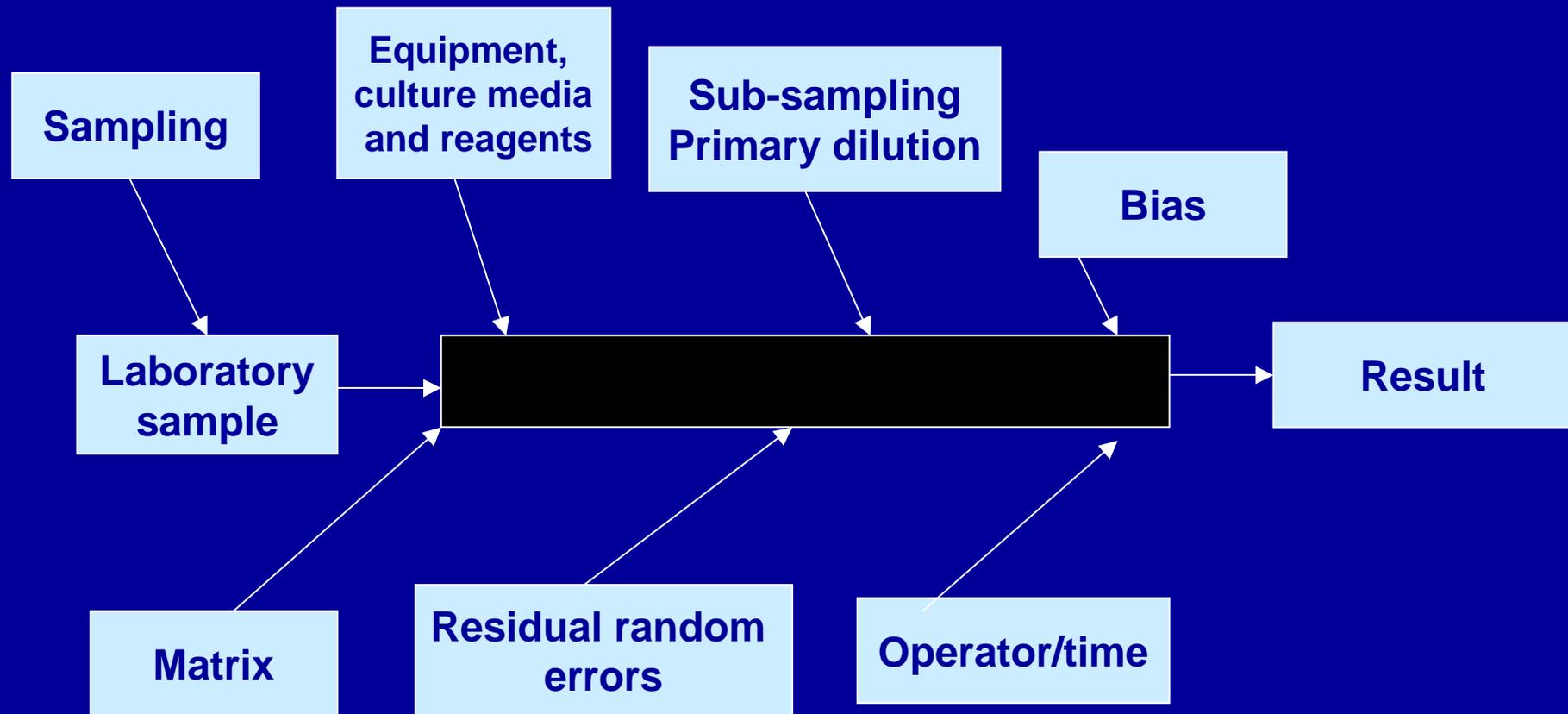
# Influenza della matrice su $S_R$

- Tra le prime 2 categorie la matrice è responsabile di circa 0,1 log dell'intero scarto tipo, indipendentemente dal laboratorio e microflora
- Matrici della III e IV categoria, se “*mixed using a blender*” possono essere assegnate alla II categoria

# $U$ - 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 (**legame metodo-laboratorio**)

# Fonti di incertezza in microbiologia



# ISO / TS 19036:2006

## CONDIZIONE DI APPLICAZIONE

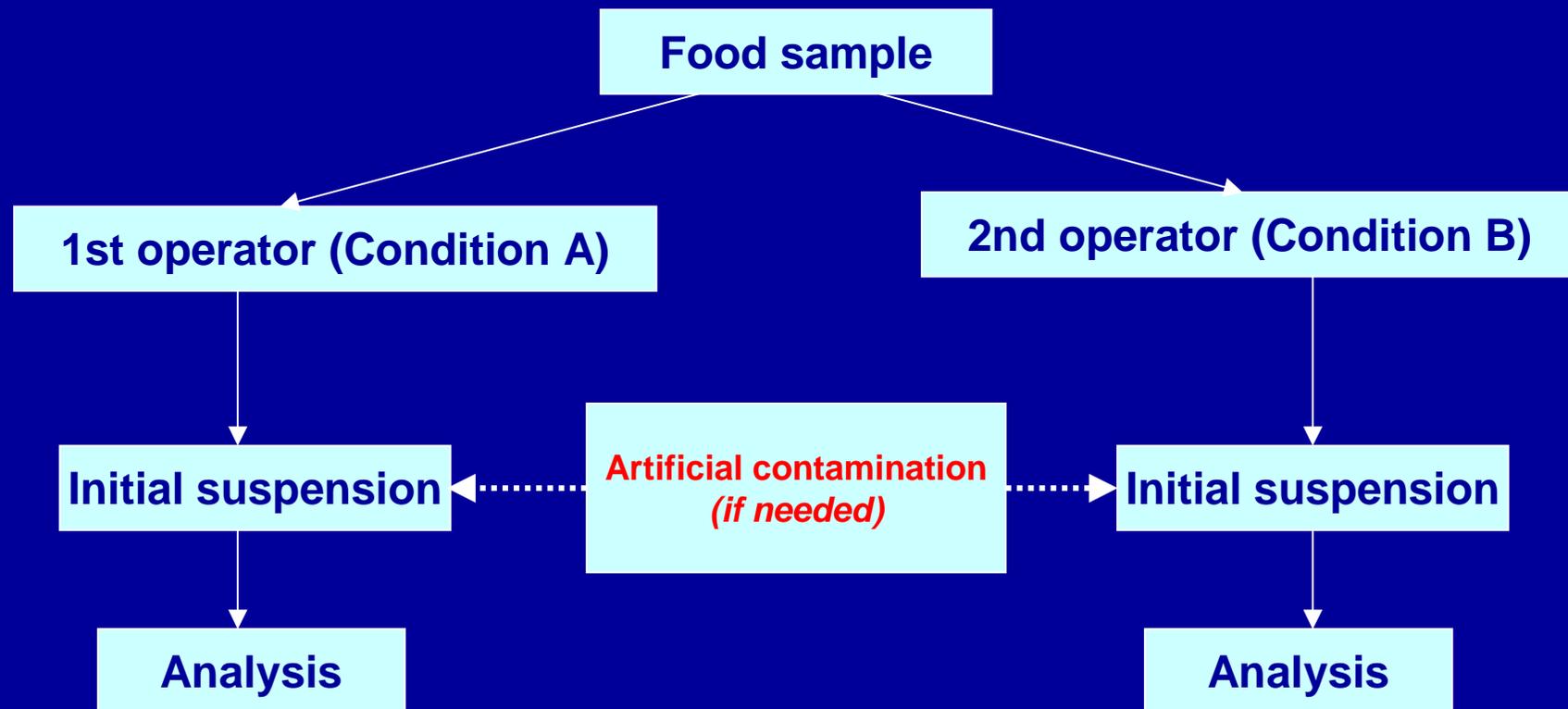
Il laboratorio deve dimostrare di  
**avere sotto controllo**  
le principali componenti di incertezza

Il *bias* come componente dell'Incertezza di Misura non viene valutato, ma è necessario dimostrare di averlo sotto controllo (evidenza mediante circuiti interlaboratorio o prove con MR/MRC)



*Bias* non valutato/stimato, ma “sotto controllo”

# Protocollo sperimentale



# Condizioni A e B

Il più possibile rappresentative delle variazioni  
che si possono incontrare  
*“from a day to another”*  
nel laboratorio

*Tecnici, lotti di terreni e reagenti, agitatori  
vortex, pHmetri, incubatori, tempo di analisi*

# Contaminazione artificiale della sospensione iniziale

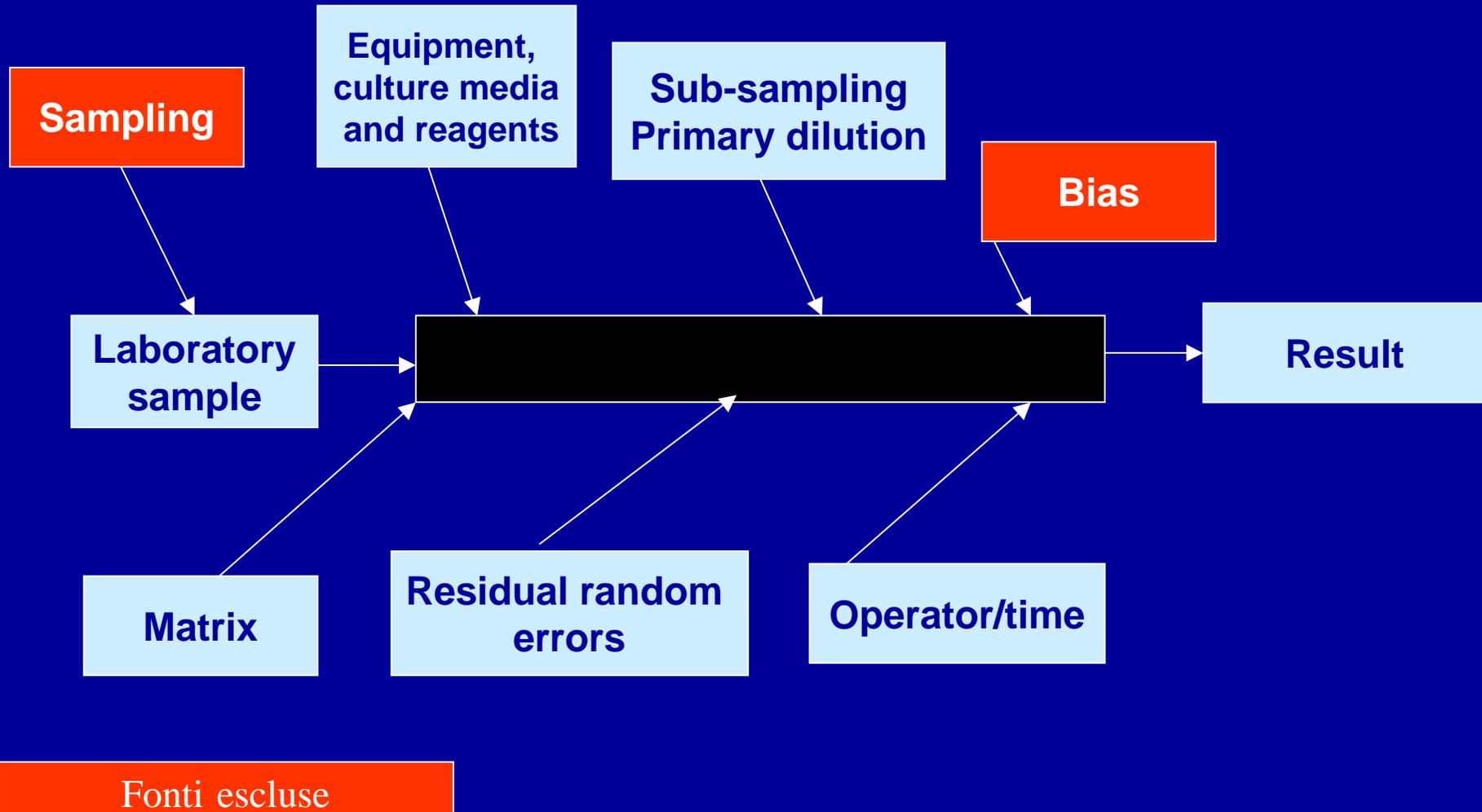
( *schema protocollo sperimentale* )

**! Attenzione !**

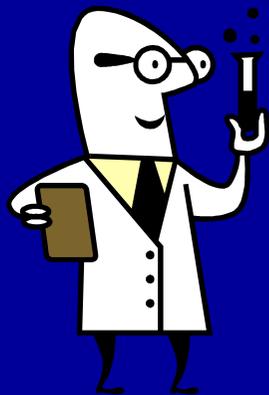
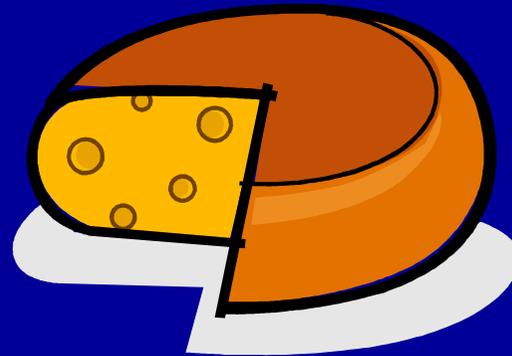
Può annullare la componente di incertezza dovuta all'eterogeneità di contaminazione della matrice, presente nei campioni “di campo”

# Fonti di incertezza in microbiologia

## Scarto Tipo INTRAlaboratorio



# Stesso campione (*instabile*) analizzato da due operatori diversi



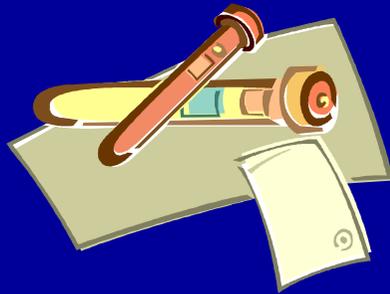
*contemporaneamente*



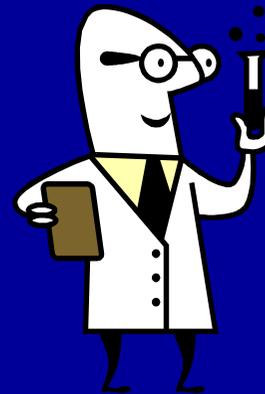
# Come procedere?



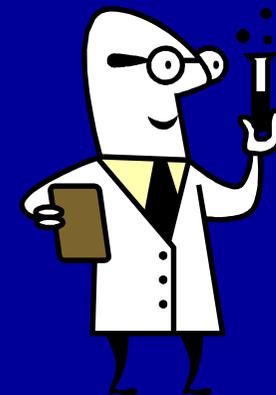
# Stesso campione (*stabile*) analizzato dallo stesso operatore in giorni diversi



**GIORNO 1**



**GIORNO 2**



# $S_R$ DI UN METODO valutazione INTRALABORATORIO

## *Protocollo sperimentale*

- **Matrice** (realmente contaminate /presenza m.o. stressati)
- **Sottocampione** (utilizzato per prelevare la 'porzione test')
- **Almeno 10 campioni per ciascuna matrice**
- **Diversi giorni in un lungo periodo di tempo**

# $S_R$ DI UN METODO valutazione INTRALABORATORIO

## *Protocollo sperimentale*

- Campioni con diversi livelli di contaminazione  
*(campioni / concentrazioni usuali del laboratorio)*
- Calcolo  $S_R$  **non** per livello di concentrazione
- Trasformazione log dei dati  
*(stabilizzazione della varianza di riproducibilità; livelli di contaminazione <10 ufc escluse!)*
- Contaminazione artificiale con MRC (se necessaria)  
*(attenzione al nuovo elemento di variabilità: simulare il più possibile la contaminazione naturale in termine di m.o. stressati / di competizione / “background microflora”)*

# $s_R$ 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 ( $n \geq 10$ )

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

# $s_R$ 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 × 10 <sup>4</sup>	8,7 × 10 <sup>4</sup>	4,83	4,94	0,006 4
2	7,1 × 10 <sup>6</sup>	6,2 × 10 <sup>6</sup>	6,85	6,79	0,001 7
3	3,5 × 10 <sup>5</sup>	4,4 × 10 <sup>5</sup>	5,54	5,64	0,004 9
4	1,0 × 10 <sup>7</sup>	4,3 × 10 <sup>6</sup>	7,00	6,63	0,067 2
5	1,9 × 10 <sup>7</sup>	1,7 × 10 <sup>7</sup>	7,28	7,23	0,001 2
6	2,3 × 10 <sup>5</sup>				0,017 2
7	5,3 × 10 <sup>8</sup>	4,1 × 10 <sup>8</sup>	8,72	8,61	0,006 2
8	1,0 × 10 <sup>4</sup>	1,2 × 10 <sup>4</sup>	4,00	4,08	0,003 1
9	3,0 × 10 <sup>4</sup>	1,3 × 10 <sup>4</sup>	4,48	4,11	0,065 9
10	1,1 × 10 <sup>8</sup>	2,2 × 10 <sup>8</sup>	8,04	8,34	0,045 3

Radice della Sommatoria/n

Conte < 10 UFC per piastra

Nel caso di conte che presentano meno di 10 UFC per piastra, **in attesa dell'Amendment alla ISO 19036**, se richiesto, esprimere l'incertezza di misura, solo se entrambe le piastre contengono meno di 10 colonie per piastra, come

Intervallo di Fiducia ricavato dalle tabelle  
A1 e A2 – della ISO 7218:1996

## ISO /TS 19036:2006 / ...Amd1

(Amd 1 - Stadio di approvazione 50.0 - 11 agosto 2008)

...la ISO 19036 parte dall'assunto che la stima dell'incertezza di misura basata sul calcolo dello scarto tipo di riproducibilità, limitata alle conte superiori a 10 UFC/piastra, trascuri l'errore casuale dato dalla distribuzione di Poisson.

# ISO /TS 19036:2006 / ...Amd1

(Stadio di approvazione 50.0 - 11 agosto 2008)

Il calcolo dell'incertezza di misura per le basse conte (<10 UFC), sempre basato sullo scarto tipo di riproducibilità, introduce nella formula un fattore di correzione che tiene conto della componente della varianza dovuta alla distribuzione di Poisson.

Tale componente avrà un peso inversamente proporzionale al numero di colonie presenti in piastra, essendo dato dal rapporto

$$\frac{0,18861}{\sum C}$$

# ISO /TS 19036:2006 / ...Amd1

(Stadio di approvazione 50.0 - 11 agosto 2008)

Nell'*Amendment 1* vengono date le condizioni, calcolabili matematicamente, per decidere di volta in volta se applicare tale fattore correttivo al calcolo dell'incertezza o considerarlo trascurabile

- in dipendenza dello scarto tipo di riproducibilità attribuito a ciascun metodo
- in dipendenza della somma delle colonie contate su tutte le piastre considerate

# ISO /TS 19036:2006 / ...Amd1

(Stadio di approvazione 50.0 - 11 agosto 2008)

**Alte conte:**  
incertezza estesa calcolata con  
scarto tipo di riproducibilità

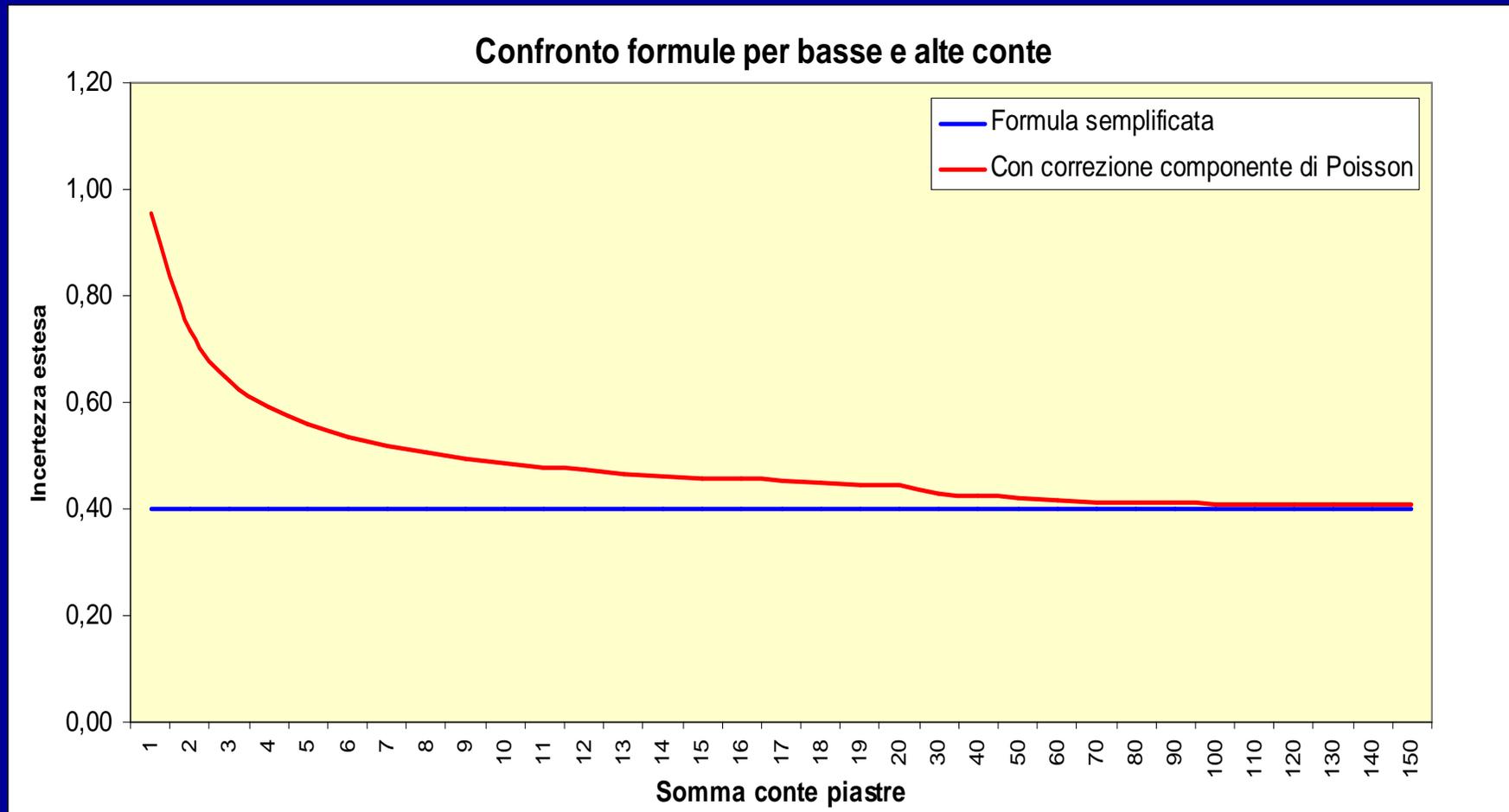
$$U = 2S_R$$

**Basse conte:**  
vengono combinate le due  
componenti

$$U = 2 \sqrt{S_R^2 + \frac{0,18861}{\sum C}}$$

# ISO /TS 19036:2006 / ...Amd1

(Stadio di approvazione 50.0 - 11 agosto 2008)



## **Studio / dati reali – protocolli sperimentali di laboratorio**

### **Matrice carne - Microorganismi a 30° C**

**Metodo ISO 4833:2003**

Operatori (A e B) che operano nello stesso laboratorio o in laboratori multisito hanno effettuato, in maniera indipendente, parallelamente, le prove su 10 campioni della matrice carne (pollo, suino, bovino, salsiccia, tritato..), utilizzando lo stesso metodo normato

## Matrice carne - Microorganismi a 30° C - ISO 4833:2003

Laboratori	Categoria/ matrice	$S_R$ ( $\log_{10}$ ) cfu/g	$U$ ( $\log_{10}$ ) cfu/g	$S_R$ <b>19036</b>
<b>A</b>	<b>II</b>	0,02	0,05	0,09 - 0,13
	<b>IV</b>	0,06	0,12	0,70
<b>B</b>	<b>II</b>	0,09	0,18	0,09
<b>C</b>	Carne (II e IV)	0,267	0,53	0,09 - 0,70

## Matrice latte - Microorganismi a 30° C - ISO 4833:2003

Laboratori	Categoria/ matrice	$S_R$ (log <sub>10</sub> ) cfu/g	$U$ (log <sub>10</sub> ) cfu/g	$S_R$ <b>19036</b>
<b>A</b>	I Latte in polvere	0,03	0,06	0,05
<b>B</b>	I	0,09	0,18	0,12
<b>C</b>	I	0,142	0,28	0,12

# Tabella A1 – ISO /TS 19036 (1)

ISO/TS 19036:2006(E)

Table A.1 — Standard deviations for aerobic mesophilic flora

Laboratory code	Food	Category	$s_{IS}$	$s_R$	$s_{res}$	$s_{cond}$
2	fish	iv	0,36	0,43	0,23	0,06
2	frozen minced veal meat	ii	0,07	0,25	0,24	0,06
3	pastries	iv	0,12	0,18	0,11	0,07
4	fish	iv	0,37	0,51	0,29	0,20
7	ready-to-eat cooked meals	iv	0,24	0,33	0,17	0,13
8	vacuum-packed minced beef meat	ii	0,09	0,15	0,10	0,06
10	packed green salad	iii	0,10	0,45	0,17	0,41
10	dehydrated onion powder	ii	0,17	0,24	0,13	0,11
11	pâté	iv	0,72	0,78	0,10	0,29
11	pastries	iv	0,05	0,19	0,12	0,13
11	dehydrated mushrooms	iii	0,14	0,26	0,15	0,16
12	chicken neck skin	iv	0,19	0,20	0,06	0,02
13	cooked snails	iv	0,06	0,13	0,10	0,05
14	pastries	iv	0,32	0,35	0,11	0,08
20	chicken neck skin	iv	0,14	0,16	0,05	0,06
20	mechanically separated turkey meat	ii	0,10	0,13	0,06	0,05
20	mechanically separated chicken meat	ii	0,10	0,14	0,09	0,05
25	pâté	iv	0,46	0,47	0,07	0,03

# Tabella A1 – ISO /TS 19036 (2)

ISO/TS 19036:2006(E)

Table A.1 — Standard deviations for aerobic mesophilic flora

Laboratory code	Food	Category	$s_{IS}$	$s_R$	$s_{res}$	$s_{cond}$
26	raw milk cheese	iv	0,16	0,26	0,09	0,19
27	sliced ham	iv	0,30	0,31	0,06	0,05
30	pastries	iv	0,09	0,12	0,06	0,05
31	grated carrots	iii	0,09	0,14	0,08	0,08
32	fresh pork sausages	iv	0,20	0,24	0,12	0,05
34	fresh pork meat	iv	0,70	0,70	0,06	0,05
38	vanilla ice cream	ii	0,03	0,10	0,09	0,02
41	milk powder (environment)	i	0,05	0,14	0,10	0,08
42	milk powder	i	0,02	0,05	0,04	0,02
43	frozen shrimps	iii	0,19	0,20	0,05	0,05
44	frozen shrimps	iii	0,09	0,18	0,14	0,08
48	milk	i	0,04	0,12	0,06	0,09
49	corn starch	i	0,09	0,14	0,06	0,08
55	packed green salad	iii	0,15	0,20	0,06	0,11
72	caseinate	i	0,03	0,09	0,08	0,04
76	water	i	0,04	0,10	0,09	0,03
77	minced beef meat	ii	0,07	0,09	0,05	0,03
79	mixed poultry meat	ii	0,03	0,13	0,09	0,07

**...in riferimento ai prerequisiti per la applicazione della 7218:2007 (singola piastra) e 19036 (*bias* ‘sotto controllo’)**

- Valutazione, prova per prova, del rispetto dei criteri di accettabilità delle conte e delle diluizioni

*(monitoraggio delle performance dei singoli operatori e del laboratorio – valutazione cumulativa)*

- Definizione, preliminare, dichiarata, di una percentuale di “prove critiche” e NC, accettabili nella *routine*

- Gestione dei dati ai fini del miglioramento delle performance tecniche del Laboratorio

*(evidenze anche per ISO 17025 - requisiti al 5.2 e 5.9)*

# Studio / dati reali

Categoria	Campione	Misurando	Metodo di prova	Prima diluizione utile	1 <sup>a</sup> diluizione Piastra 1	1 <sup>a</sup> diluizione Piastra 2	2 <sup>a</sup> diluizione Piastra 1	2 <sup>a</sup> diluizione Piastra 2	G2	GIUDIZIO
										Omogeneità TOTALE
										G <sup>2</sup>
II	Carne tritata	Microrganismi aerobi mesofili	AFNOR 3M-01/01-09/89	2	44	51	5	8	2,25	OK
II	Carne tritata	Microrganismi aerobi mesofili	AFNOR 3M-01/01-09/89	3	163	157	20	20	1,78	OK
II	Carne tritata	Microrganismi aerobi mesofili	AFNOR 3M-01/01-09/89	3	116	134	19	14	4,15	OK
II	Carne tritata	Microrganismi aerobi mesofili	AFNOR 3M-01/01-09/89	3	17	29	3	5	5,5	OK
II	Carne tritata	Microrganismi aerobi mesofili	AFNOR 3M-01/01-09/89	3	58	40	5	1	7,81	OK
II	Carne tritata	Microrganismi aerobi mesofili	AFNOR 3M-01/01-09/89	3	62	68	8	3	2,93	OK

...continua

SCARTO TIPO DI RIPRODUCIBILITA' INTRALABORATORIO:  $S_R = 0.12 \log$

INCERTEZZA ESTESA DI MISURA:  $U = \pm 0.24 \log$

# Studio / dati reali

Categoria	Campione	Misurando	Metodo di prova	Prima diluizione utile	1 <sup>a</sup> diluizione Piastra 1	1 <sup>a</sup> diluizione Piastra 2	2 <sup>a</sup> diluizione Piastra 1	2 <sup>a</sup> diluizione Piastra 2	G2	GIUDIZIO
										Omogeneità TOTALE
										G <sup>2</sup>
IV	Carne non tritata	Enterobatteri	AFNOR 3M-01/06-09/97	1	117	95	15	9	4,12	OK
IV	Carne non tritata	Enterobatteri	AFNOR 3M-01/06-09/97	1	40	62	4	1	7,34	Critico
IV	Carne non tritata	Enterobatteri	AFNOR 3M-01/06-09/97	1	22	35	0	1	4,54	OK
IV	Carne non tritata	Enterobatteri	AFNOR 3M-01/06-09/97	1	89	102	16	10	4,3	OK
IV	Carne non tritata	Enterobatteri	AFNOR 3M-01/06-09/97	1	55	49	2	7	3,47	OK
IV	Carne non tritata	Enterobatteri	AFNOR 3M-01/06-09/97	1	81	69	6	6	1,55	OK
IV	Carne non tritata	Enterobatteri	AFNOR 3M-01/06-09/97	1	73	80	8	5	1,35	OK
IV	Carne non tritata	Enterobatteri	AFNOR 3M-01/06-09/97	1	86	90	12	7	1,52	OK

SCARTO TIPO DI RIPRODUCIBILITA' INTRALABORATORIO:

$$S_R = 0.13 \log$$

INCERTEZZA ESTESA DI MISURA:

$$U = \pm 0,26 \log$$

...continua

# Studio / dati reali

Categoria	Campione	Misurando	Metodo di prova	Prima diluizione utile	1 <sup>a</sup> diluizione Piastra 1	1 <sup>a</sup> diluizione Piastra 2	2 <sup>a</sup> diluizione Piastra 1	2 <sup>a</sup> diluizione Piastra 2	G2	GIUDIZIO
										Omogeneità TOTALE
										G <sup>2</sup>
I	Acque destinate al consumo umano	Enterococchi intestinali	DLgs n°31 02/02/2001 GU n°52 03/03/2001 + UNI EN ISO 7899-2:2003		96	72			3,44	OK
I	Acque destinate al consumo umano	Enterococchi intestinali	DLgs n°31 02/02/2001 GU n°52 03/03/2001 + UNI EN ISO 7899-2:2003		91	124			5,09	Critico
I	Acque destinate al consumo umano	Enterococchi intestinali	DLgs n°31 02/02/2001 GU n°52 03/03/2001 + UNI EN ISO 7899-2:2003		83	94			0,68	OK
I	Acque destinate al consumo umano	Enterococchi intestinali	DLgs n°31 02/02/2001 GU n°52 03/03/2001 + UNI EN ISO 7899-2:2003		105	136			4	Critico
I	Acque destinate al consumo umano	Enterococchi intestinali	DLgs n°31 02/02/2001 GU n°52 03/03/2001 + UNI EN ISO 7899-2:2003		61	74			1,25	OK

...continua

SCARTO TIPO DI RIPRODUCIBILITA' INTRALABORATORIO:

$$S_R = 0.13 \log$$

INCERTEZZA ESTESA DI MISURA:

$$U = \pm 0.27 \log$$

# **COME UTILIZZIAMO L'INCERTEZZA?**

**Un interrogativo delle  
Aziende di produzione, dei Clienti e  
delle Autorità sanitarie**

# INCERTEZZA DI MISURA (§ 5.4.6)

## *1. CHI la richiede?*

- **Il Cliente** – se previsto da specifiche interne (definito nel contratto con il Laboratorio)
- **La Normativa** – in presenza di limiti su cui si basano decisioni di conformità ad una specifica

## *2. QUANDO va espressa?*

- **Necessario confrontare i risultati delle misurazioni tra di loro, con valori di riferimento assegnati da specifiche o da norme (rif UNI CEI ENV 13005:2000)**

# INCERTEZZA DI MISURA

(ISO/TS 19036:2006 )

## 3. *COME* va espressa?

- Risultato ed Intervallo in  $\log_{10}$   
 $5,0 \log \pm 0,2 \log(UFC)/g$  oppure  $5,0 \log [ 4,8 , 5,2 ]$
- Risultato ed Intervallo in Valore naturale  
 $100.000 UFC/g [ 63.000 , 160.000 ]$   
 $10^5 UFC/g [ 6,3 \times 10^4 , 1,6 \times 10^5 ]$
- Intervallo in percentuale  
 $100.000 UFC/g [ 100.000 -37\% , 100.000 +58\% ]$

# INCERTEZZA DI MISURA

(ISO/TS 19036:2006 )

## ***4. DOVE va espressa?***

**Sul R. di P.: come incertezza estesa  $U$   
associata al risultato nella sua stessa forma  
(log, n°) oppure espressa in percentuale (%)**

**Definiti: il Livello di probabilità  $p$  ed il  
Fattore di copertura  $k$**

**Gradi di Libertà: N.A.;      Recupero: N.A.**

## ....requisito aggiuntivo

(rif. Verbale Corso agg.to SINAL 2007)

Dichiarare sul Rapporto di prova che la prova è stata eseguita su singola piastra nel caso il metodo accreditato preveda la semina su doppia piastra ed il Laboratorio si sia allineato a quanto nella ISO 7218: 2007 ... prove eseguibili su singola piastra.

# ISO/TS 19036:2006

## Considerazioni e Stato di avanzamento

- E' già stato verificato che non sempre è un approccio adeguato (basse conte; matrici omogenee – acqua)
- ISO/TC 34/SC 9 implementazione/revisione della 19036, alla luce dei dati raccolti
- ISO/TC 34/SC 9 attivo anche per *U* prove  
QUALITATIVE

$S_R$  DI UN METODO  
da

studio INTERLABORATORIO

# $s_R$ DI UN METODO da studio INTERLABORATORIO

Scopo: VALIDAZIONE di un METODO

- Scarto tipo di riproducibilità utilizzata per calcolare l' $U$  in specifiche condizioni\*\*
- Scarto tipo di riproducibilità è legata al metodo e non al laboratorio

## \*\*PREREQUISITO 1

- BIAS del laboratorio deve essere compatibile con bias atteso sulla base dei *dati di precisione (r e R) del metodo* derivati dallo studio INTERlaboratorio.

# $s_R$ DI UN METODO da studio INTERLABORATORIO

## **\*\*PREREQUISITO 2**

- La precisione del laboratorio deve essere compatibile con quella attesa sulla base dei *dati di ripetibilità e riproducibilità del metodo* derivati dallo studio INTERlaboratorio.

# $s_R$ DI UN METODO da studio INTERLABORATORIO

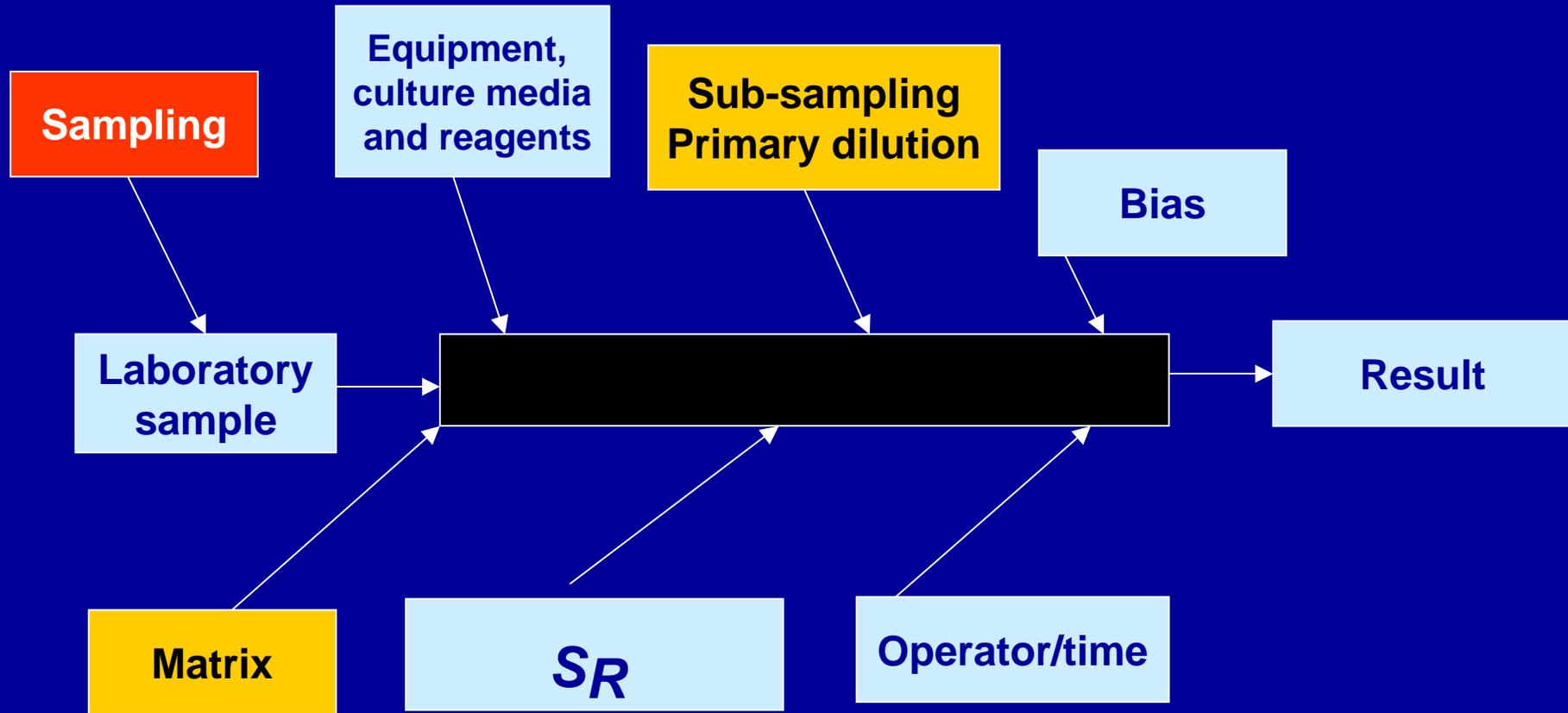
## **\*\*PREREQUISITO 3**

- Lo studio INTERlaboratorio abbia coperto tutte le fonti di incertezza (soprattutto preparazione e omogeneizzazione del campione).

*Necessario conoscere il protocollo sperimentale!*

# Fonti di incertezza in microbiologia

## Studio interlaboratorio



Fonti escluse

Esclusione legata al tipo di protocollo

# Vantaggi e limiti

- Tale approccio consente ad un laboratorio che ha partecipato allo studio interlaboratorio di valutare il proprio *bias* come parte della componente *bias* dell'incertezza di misura (aspetto non trattato nella ISO 19036).
- I limiti riportati di seguito giustificano la scelta di considerare tale approccio come opzione n. 2

# $s_R$ DI UN METODO da studio INTERLABORATORIO

## LIMITI

Se da un lato è richiesto che precisione e bias del laboratorio siano conformi a quelli dello studio interlaboratorio, dall'altro bisogna riconoscere che solo pochi metodi normati riferiscono dati di  $R$

- ISO 7932 (*B. cereus*)
- ISO 7937 (*C. perfringens*)
- ISO 6888 parte 1 e 2 (*S. coagulans* positivo)
- ISO 11290-2 (*L. monocytogenes*)

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

# $s_R$ DI UN METODO da studio INTERLABORATORIO

## LIMITI

I valori di precisione derivati da uno studio INTERlaboratorio sono ottenuti in **condizioni molto limitate** quanto a

- combinazioni di matrici,
- ceppi di microrganismi,
- livello di contaminazione e
- microflora contaminante (se presente)

# $s_R$ DI UN METODO da studio INTERLABORATORIO

## LIMITI

Uno studio INTERlaboratorio richiede **campioni molto omogenei e stabili**, obiettivo che porta ad una **riduzione** della naturale **variabilità** che si troverebbe in pratica (sottostima dell'incertezza)

$S_R$  DI UN METODO  
da

*INTERLABORATORY PROFICIENCY TRIAL*

# $s_R$ DI UN METODO

da *INTERLABORATORY PROFICIENCY TRIAL*

## Prerequisiti per utilizzare tale $s_R$

- Il laboratorio ha usato nel trial il metodo applicato usualmente nelle analisi
- I **campioni** usati nel trial siano **comparabili** (matrice e livello di concentrazione microbica) **con quelli analizzati di norma nel laboratorio**
- I laboratori **partecipanti al trial** abbiano usato prevalentemente lo **stesso metodo**

## ISO 7218:2007 e ISO/TS 19036 - **F.A.Q. N. 1**

Se in base alla ISO 7218:2007 i laboratori accreditati decidessero di adottare, per le conte, la singola piastra, la  $S_R$  va calcolata utilizzando dati derivanti da conteggi in singola piastra o in doppio come da ISO specifica del metodo in analisi?

## F.A.Q. n. 1 - Risposta

Singola o doppia ...

purché sia la stessa procedura analitica che il laboratorio ha scelto per i propri campioni di prova, di *routine*

Ma se la matrice è ...

ACQUA?

# **CALCOLO DELL'INTERVALLO DI FIDUCIA**

- **UNI ENV ISO 13843:2003. Qualità dell'acqua – Guida per la validazione di metodi microbiologici**
- **UNI 10674:2002. Acque destinate al consumo umano – Guida generale per determinazioni microbiologiche**
- **ISO 8199:2005 – Water quality –General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture**

# UNI 10674:2002

## INTERVALLO DI FIDUCIA

Caso di conta su una sola piastra

$$C_1 = 67$$

Calcolo risultato conteggio e intervallo di fiducia

$$C_i \pm 2\sqrt{C_i}$$

$$C = 67 \pm 2\sqrt{67} = 67 \pm 16$$

# UNI 10674:2002

## INTERVALLO DI FIDUCIA

### Caso di conta su 2 piastre

Conte comprese tra 15 e 300 ufc per piastra

$$I.F. = \pm k_p \sqrt{\frac{C_m}{n}}$$

n = numero di piastre (prove)

$C_m$  = media delle n conte

$K_p$  = fattore di copertura per  $p = 95\%$   
1,96 arrotondato a 2,0

Limite inferiore:

$$C_m - 2,0 \sqrt{\frac{C_m}{2}}$$

$$C_m - 1,4 \sqrt{C_m}$$

Limite superiore:

$$C_m + 2,0 \sqrt{\frac{C_m}{2}}$$

$$C_m + 1,4 \sqrt{C_m}$$

# ISO 8199:2005 *Water quality – General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture*

Calcolo intervallo di fiducia (IF)

per  $Z \geq 20$

$$C_s \pm 95\% IF = \left( \frac{Z}{V_{tot}} \pm \frac{2\sqrt{Z}}{V_{tot}} \right) \times V_s$$

per  $Z < 20$

$$C_s \pm 95\% IF = \left( \frac{Z + 2}{V_{tot}} \pm \frac{2\sqrt{Z + 1}}{V_{tot}} \right) \times V_s$$

dove

- $C_s$  è la stima del numero espresso come UFC (conteggio) nel volume di riferimento  $V_s$ .
- $Z$  è la somma delle colonie contate sulle piastre o membrane derivate dalle diluizioni considerate nel calcolo del risultato
- $V_{tot}$  è il volume totale del campione originale distribuito nelle piastre sottoposte a conta.

# Alternative alla ISO/TS 19036?

Stima delle singole componenti secondo  
l'approccio del MIKES

***STIMA DELLE  
PRINCIPALI COMPONENTI DELL'INCERTEZZA  
NELLE PROVE MICROBIOLOGICHE***

- Distribuzione casuale delle cellule microbiche
- Volume di inoculo
- Diluizioni
- Lettura del risultato



# Approccio per Singole Componenti

## Valutazioni preliminari

Calcolo sperimentale della ripetibilità di dosaggio delle pipette  
(scarto tipo del volume di inoculo)

Calcolo sperimentale della ripetibilità di dosaggio del diluente  
(scarto tipo del volume di diluente)

Calcolo sperimentale della ripetibilità di conteggio degli operatori  
(incertezza di lettura delle piastre)

# CALCOLO DELLE COMPONENTI D'INCERTEZZA

**Incertezza dovuta alla Distribuzione di Poisson  
Incertezza di lettura delle piastre**



# Incertezza di conteggio

*dovuta alla lettura delle capsule*

## Incertezza media di conteggio di capsule in singolo

- Rilettura in ordine casuale delle capsule
- Breve lasso di tempo tra le due letture
- Almeno una trentina di capsule

# CALCOLO DELLE COMPONENTI D'INCERTEZZA

## Incertezza dovuta al dosaggio degli inoculi



# CALCOLO DELLE COMPONENTI D'INCERTEZZA

## Incertezza dovuta al fattore di diluizione



# CALCOLO DELLE COMPONENTI D'INCERTEZZA

## Eventuale Incertezza di conferma delle colonie





# Componenti dell'incertezza

Componenti incertezza	Quando contribuiscono all'incertezza?
Distribuzione di Poisson $u(Z)/Z$	Comune a tutti i conteggi (di facile calcolo, è inversamente proporzionale al numero di colonie contate)
Volume totale inoculato $u(V)/V$	Comune a tutti i conteggi è legata alla ripetibilità di dosaggio degli inoculi. E' richiesta una valutazione sperimentale della ripetibilità del dosaggio con le pipette.
Fattore di diluizione $u(F)/F$	In presenza di diluizioni (è legata alla numerosità delle diluizioni allestite e alla ripetibilità di dosaggio dei volumi del diluente) E' richiesta una valutazione sperimentale della ripetibilità del dosaggio del diluente.
Lettura piastre $u(L)/L$	Comune a tutti i conteggi, richiede una preliminare valutazione della ripetibilità dei conteggi da parte degli operatori.
Conferma colonie $u(p)/p$	Solo se richiesta la conferma delle colonie. In tale caso comprende e quindi sostituisce $u(Z)/Z$ ( <i>distribuzione di Poisson</i> )

# Calcolo finale dell'incertezza di misura

basata sulla stima delle componenti di incertezza dell'analisi

Incetezza **relativa** del risultato della prova  
Prove che non prevedono la conferma

$$u(y)/y = \sqrt{[u(Z)/Z]^2 + [u(V)/V]^2 + [u(F)/F]^2 + [u(L)/L]^2}$$

Incetezza di misura = Risultato x Incetezza relativa  $u(y)/y$



# Metodo “semplificato”

## Basato sul calcolo del parametro $G^2$

**NON** richiede il calcolo delle singole componenti di incertezza, ma tiene conto delle componenti date da

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

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



# Metodo semplificato

$$u(y)/y = \sqrt{\left[ \frac{u(\bar{x})}{\bar{x}} \right]^2 + \left[ \frac{u(F)}{F} \right]^2}$$

In cui

$$\left[ \frac{u(\bar{x})}{\bar{x}} \right]^2 = \frac{G_{n-1}^2}{n-1} \cdot \frac{1}{Z}$$

Il metodo semplificato permette di valutare l'incertezza relativa che **include tutte le componenti casuali** che influenzano le conte.

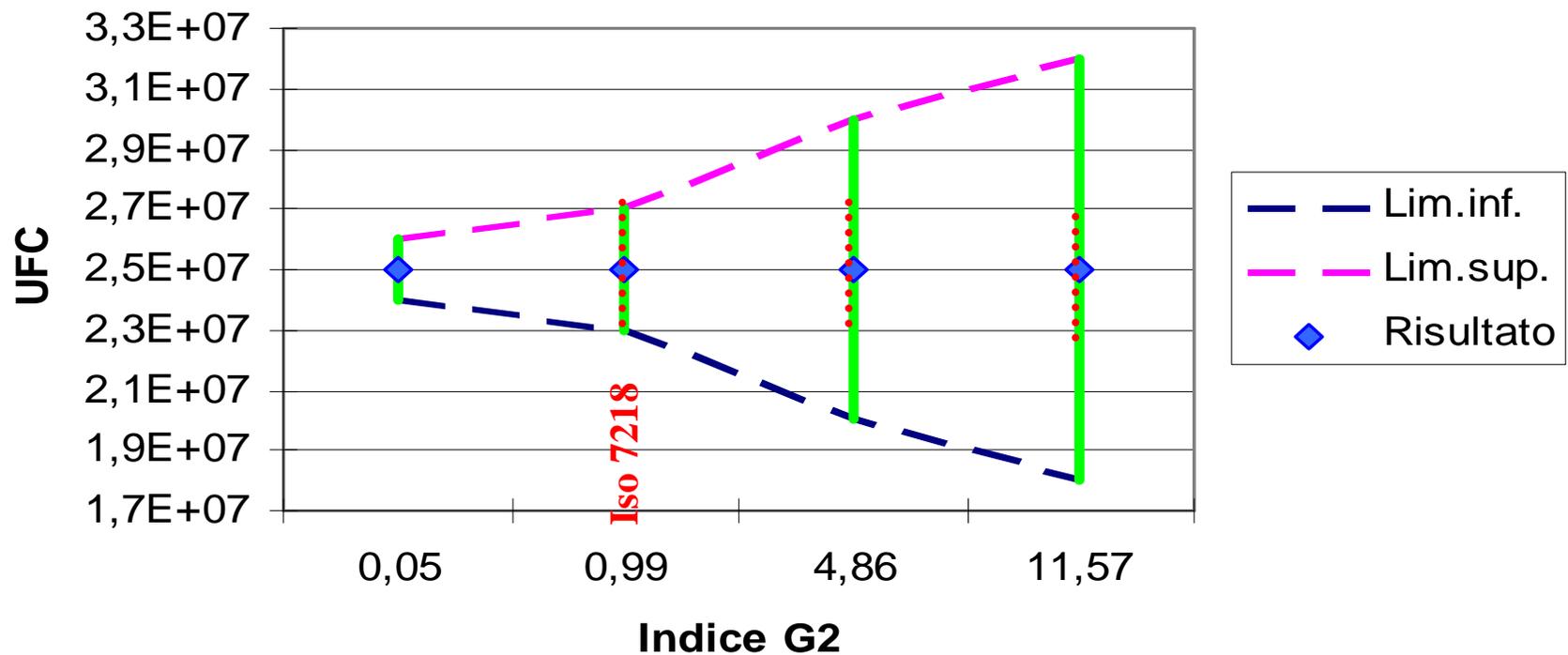
*Diverse combinazioni di conta di colonie  
Medesimo conteggio microbico per unità di campione*

Prova	Diluizioni				Risultato (UFC)	$\frac{G^2_{n-1}}{n-1}$	Incertezza estesa $U$	Limite inferiore	Limite superiore
	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$					
n. 1	249	248	23	24	$2,5 \times 10^7$	<b>0,05</b>	$\pm 510.000$	$2,4 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$
n. 2	240	244	33	27	$2,5 \times 10^7$	<b>0,99</b>	$\pm 2.100.000$	$2,3 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$
n. 3	204	280	28	32	$2,5 \times 10^7$	<b>4,86</b>	$\pm 4.700.000$	$2,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
n. 4	184	300	22	38	$2,5 \times 10^7$	<b>11,57</b>	$\pm 7.300.000$	$1,8 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$
Prove n. 1, 2, 3 e 4					$2,5 \times 10^7$	<b>ISO 7218</b>	---	$2,3 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$

Mediante calcolo secondo **ISO 7218:1996**  
nei diversi casi si sarebbe ottenuto lo stesso intervallo di fiducia

# Vantaggi del metodo semplificato

**Metodo semplificato: medesimo conteggio  
Incertezza funzione della qualità del dato analitico**



# DOCUMENTI di RIFERIMENTO

- UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2000 – Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura
- UNI CEI ENV 13005:2000 - Guida all'espressione dell'incertezza di misura
- MIKES - Centre for metrology and accreditation, Publication J4/2003, Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms, Seppo I. Niemela
- **ISO 7218:1996/Amd. 1:2001 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examination**
- **ISO 7218:2007 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations**
- ISO/TS 19036:2006 - Microbiology of food and animal feeding stuffs –Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations
- UNI ENV ISO 13843:2003. Qualità dell'acqua – Guida per la validazione di metodi microbiologici
- UNI 10674:2002. Acque destinate al consumo umano – Guida generale per determinazioni microbiologiche
- ISO 8199:2005 – Water quality –General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture

**SI RINGRAZIANO I LABORATORI  
N°ACCR.0198, 0429, 0296  
e cod n. 0849  
PER AVER FORNITO ALCUNI DATI  
SPERIMENTALI UTILIZZATI NELLA  
PRESENTAZIONE**