

CORSO
ACCREDIA E ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Le disposizioni in materia di sicurezza alimentare
applicate ai Laboratori Accreditati
15-16 novembre 2011

Validazione, stima dell'incertezza e
assicurazione del dato analitico
nel settore della microbiologia degli alimenti
in base alla 17025

Dino Spolaor

REQUISITI TECNICI della norma ISO17025

Validazione di metodi microbiologici (5.4.5)

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

Quando:

- a. metodi non normalizzati;
- b. progettati dal laboratorio;
- c. normalizzati utilizzati fuori Campo di Applicaz.;
- d. estensioni e modifiche di metodi normalizzati

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

*Tecniche utilizzabili per
determinare le prestazioni di un metodo
(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

LA VALIDAZIONE COMPRENDE

- Specifica dei requisiti del metodo
- Determinazione caratteristiche del metodo
- Controllo che i requisiti siano soddisfatti
- Dichiarazione relativa alla validità
(procedure utilizzate, risultati ottenuti, idoneità uso previsto)
- Riesami regolari (verifica che i requisiti continuino ad essere rispettati)

VALIDAZIONE DI UN METODO DI PROVA INTERNO

- La validazione è sempre un bilancio fra costi, rischi e possibilità tecniche

Alcune riflessioni ...

- Conviene al laboratorio?
- Responsabilità legali?

REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 sui criteri
microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

Metodi di prova alternativi

Articolo 5

L'impiego di metodi d'analisi alternativi è accettabile quando tali metodi sono validati in base al metodo di riferimento di cui all'allegato I e se è utilizzato un metodo proprietario certificato da una terza parte in base al protocollo definito nella norma EN/ISO 16140 o ad altri protocolli analoghi accettati a livello internazionale.

Organismi di validazione

AFNOR Validation

www.afnor-validation.org

MicroVal

www.microval.org

NordVal

<http://www.nmkl.org/Engelsk/index.htm>

Validazione metodi NordVal c/o NMKL

- NordVal
- c/o National Veterinary Institute
P.O.Box 750 Sentrum
N-0106 Oslo - Norway
- Price-list
Updated: 28.02.2011
- Application fee for one method covering two or more matrix groups
EUR 9.500
- Application fee for one method covering one matrix group and extension of an approved method with new matrices
EUR 4.800

ISO CD 17994:2004

- **Water quality -- Criteria for establishing equivalence between microbiological methods**
- **Qualità dell'acqua – Criteri per la definizione di equivalenza fra metodi microbiologici**

UNI EN ISO 16140:2005 e ISO 16140:2003/Amd1:2011

Microbiology of food and animal feeding stuffs
Protocol for the validation of alternative methods UNI EN ISO 16140:2005

Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali

PROTOCOLLO PER LA VALIDAZIONE DI METODI ALTERNATIVI

PROTOCOLLO DI VALIDAZIONE

Fase 1. Confronto di metodo alternativo con un metodo di riferimento

(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)

Fase 2. Studio interlaboratorio per ciascuno dei due metodi

Le due fasi possono essere condotte in parallelo

ISO/IEC 17025 - 5.4.2

Verifica prestazione metodo

Il laboratorio deve confermare che può correttamente eseguire i metodi normalizzati prima di metterli in opera per le prove e/o le tarature. Nel caso di cambiamento del metodo la conferma deve essere ripetuta.

- Stabilire modalità e frequenza della verifica (es. ripetibilità, materiali riferimento, circuiti proficiency test)

REQUISITI TECNICI della norma ISO17025

Stima dell'incertezza di misura (5.4.6)

5.4.6.2 I laboratori di prova devono avere e devono applicare delle procedure per stimare l'incertezza di misura. In certi casi la natura dei metodi di prova può escludere il calcolo rigoroso dell'incertezza di misura, valido dal punto di vista metrologico e statistico. In questi casi ... almeno tentare di identificare tutte le componenti dell'incertezza e fornire una stima ragionevole ...

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.

CALCOLO DEL CONTEGGIO (ISO 7218)

- Un grande impegno dei laboratori per calcolare l'incertezza di misura ma ... assicuriamoci prima di applicare correttamente la formula di calcolo del conteggio!

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

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.
(→ Amd1:2009)
- Prove QUALITATIVE → elaborazione di un nuovo documento

SCARTO TIPO DI RIPRODUCIBILITA' (s_R)

Modalità di Calcolo

in ordine di preferenza

1th - s_R intralaboratorio (Riproducibilità intralaboratorio)

2th - s_R di un metodo (dati di validazione interlaboratorio)

3th - s_R da *proficiency trial*, interlaboratorio

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.)

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,)

$$U = 2S_R$$

Incertezza estesa 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)

Stesso campione (instabile) analizzato da due operatori diversi



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



S_R DI UN METODO valutazione INTRALABORATORIO

Protocollo

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

S_R DI UN METODO Valutazione INTRALABORATORIO

Protocollo

- Campioni con diversi livelli di contaminazione (quelli usuali del lab)
- Calcolo S_R **non** per livello
- Trasformazione log dei dati (stabilizzazione della varianza di riproducibilità / livelli di contaminazione (<10 ufc escluse!))
- Contaminazione artificiale (se richiesta): 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	$6,7 \times 10^4$	$8,7 \times 10^4$	4,83	4,94	0,006 4
2	$7,1 \times 10^5$	$6,2 \times 10^6$	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	$2,3 \times 10^5$		Radice della Sommatoria/n		0,017 2
7	$5,3 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	8,72	8,61	0,008 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

ISO /TS 19036:2006 /Amd1:2009

... la ISO 19036:2006/Amd1:2009 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.

UNI ENV ISO 13843:2003 p. 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.

ISO /TS 19036:2006 /Amd1:2009

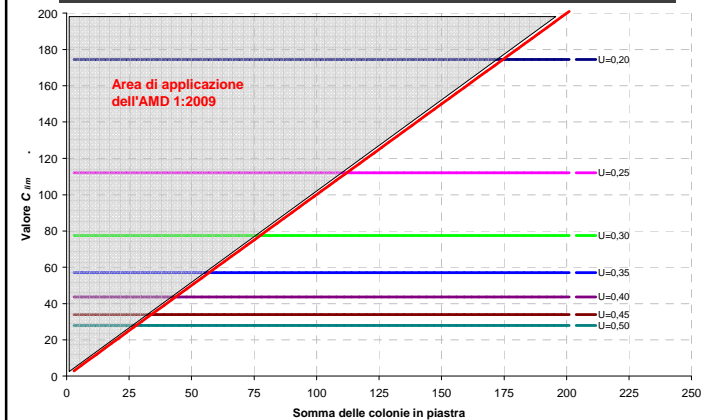
Se $\Sigma C > C_{lim}$
incertezza estesa calcolata con
scarto tipo di riproducibilità

$$U = 2S_R$$

Se $\Sigma C \leq C_{lim}$
vengono combinate le due
componenti

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

Concetto delle basse conte



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)

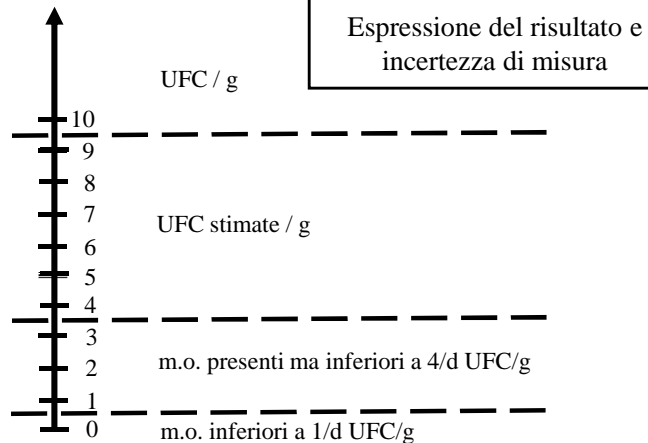
4. *DOVE* va espressa?

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.



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
- DRAFT INTERNATIONAL STANDARD ISO/DIS 29201:2010 Water quality — The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods

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

Calcolo intervallo di fiducia (IF)

$$\text{per } Z \geq 20 \quad C_s \pm 95\% IF = \left(\frac{Z}{V_{tot}} \pm \frac{2\sqrt{Z}}{V_{tot}} \right) \times V_s$$

$$\text{per } Z < 20 \quad C_s \pm 95\% IF = \left(\frac{Z+2}{V_{tot}} \pm \frac{2\sqrt{Z+1}}{V_{tot}} \right) \times V_s$$

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.

DRAFT INTERNATIONAL STANDARD ISO/DIS 29201:2010 Water quality — The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods

- Breve descrizione dei diversi approcci nazionali (francese, norvegese, inglese e neozelandese)
- Presentazione di due possibili approcci: *Bottom-up* (ISO 19036) e *step-by-step*
- Criteri di scelta tra i 2 approcci
- Esempi applicativi

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

Incetezza dovuta alla Distribuzione di Poisson
Incetezza di lettura delle piastre



Incetezza di conteggio
dovuta alla lettura delle capsule

Incetezza 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

Incerteza dovuta al dosaggio degli inoculi



D.Spolaor, A.Maiello - Validazione, Incerteza di misura, Assicurazione qualità dato analitico

45

CALCOLO DELLE COMPONENTI D'INCERTEZZA

Incerteza dovuta al fattore di diluizione



D.Spolaor, A.Maiello - Validazione, Incerteza di misura, Assicurazione qualità dato analitico

46

CALCOLO DELLE COMPONENTI D'INCERTEZZA

Eventuale Incerteza di conferma delle colonie



D.Spolaor, A.Maiello - Validazione, Incerteza di misura, Assicurazione qualità dato analitico

47

Componenti dell'incerteza

Componenti incerteza	Quando contribuiscono all'incerteza?
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 $u(Z)/Z$ (distribuzione di Poisson)

D.Spolaor, A.Maiello - Validazione, Incerteza di misura, Assicurazione qualità dato analitico

48

Calcolo finale dell'incertezza di misura

basata sulla stima delle componenti di incertezza dell'analisi

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

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

Incertezza di misura = Risultato x Incertezza 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

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

In cui

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

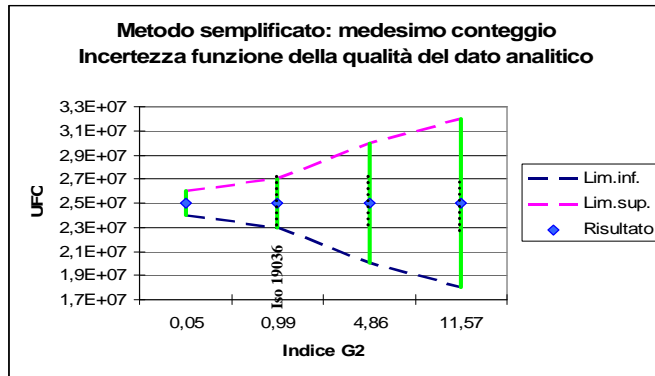
Il metodo semplificato permette di valutare l'incertezza relativa che **include tutte le componenti casuali** che influenzano le conte.

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

Prova	Diluzioni				Risultato (UFC)	$\frac{G_{n-1}^2}{n-1}$	Incertezza estesa U	Limite inferiore	Limite superiore
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸					
n. 1	249	248	23	24	2,5 x 10 ⁷	0,05	± 510.000	2,4 x 10 ⁷	2,6 x 10 ⁷
n. 2	240	244	33	27	2,5 x 10 ⁷	0,99	± 2.100.000	2,3 x 10 ⁷	2,7 x 10 ⁷
n. 3	204	280	28	32	2,5 x 10 ⁷	4,86	± 4.700.000	2,0 x 10 ⁷	3,0 x 10 ⁷
n. 4	184	300	22	38	2,5 x 10 ⁷	11,57	± 7.300.000	1,8 x 10 ⁷	3,2 x 10 ⁷
Prove n. 1, 2, 3 e 4					2,5 x 10 ⁷	ISO 19036	---	2,3 x 10 ⁷	2,7 x 10 ⁷

Mediante calcolo secondo ISO 19036 nei diversi casi si sarebbe ottenuto lo stesso intervallo di fiducia

Vantaggi del metodo semplificato



D.Spolaor, A.Maiello - Validazione, Incertezza di misura, Assicurazione qualità dato analitico

53

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
- ISO/TS 19036:2006/Amd1.2009 - Microbiology of food and animal feeding stuffs –Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations, Measurement uncertainty for low counts
- 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
- DRAFT INTERNATIONAL STANDARD ISO/DIS 29201:2010 Water quality — The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods

<https://sites.google.com/site/incertezzamicro/home/guida>

D.Spolaor, A.Maiello - Validazione, Incertezza di misura, Assicurazione qualità dato analitico

54

REQUISITI TECNICI della norma ISO17025

*Assicurazione della qualità
dei risultati di prova (5.9)*

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.

D.Spolaor, A.Maiello - Validazione, Incertezza di misura, Assicurazione qualità dato analitico

56

Qualifica del personale tecnico Mantenimento della qualifica

- Prove di ripetibilità nello svolgimento delle prove
- Partecipazione a prove valutative in circuiti interlaboratorio
- Valutazione della qualità delle prestazioni analitiche (es. G^2)

Valutazione qualità del dato analitico

- Monitorare la validità delle prove eseguite.
- Registrare i dati in modo che le linee di tendenza siano rivelabili
- Eventuale applicazione di tecniche statistiche per riesaminare i risultati
- **Analisi dei dati e adozione di misure per correggere eventuali problemi e prevenire l'emissione di dati non corretti**

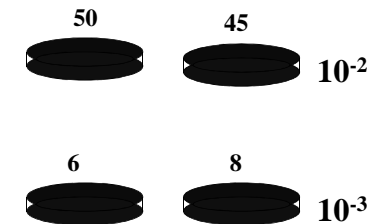
Pianificazione del monitoraggio

Il monitoraggio deve essere pianificato e riesaminato prevedendo:

- l'utilizzo regolare di materiali di riferimento
- la partecipazione a programmi di prove interlaboratorio
- la ripetizione di prove

Nota. I metodi selezionati dovrebbero essere appropriati al tipo e al volume delle attività svolte.

VALUTARE L'OMOGENEITÀ GENERALE TRA LE DILUIZIONI E TRA LE PIASTRE RIPETUTE



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

UNI ENV ISO 13843:2003 p. 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. 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).

INDICE DI DISPERSIONE DI POISSON

(UNI ENV ISO 13843:2003)

$$\bar{c} \geq 15 \quad (n > 2)$$

Criterio di accettabilità per n prove replicate di uno stesso campione

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

n = numero di piastre parallele della diluizione *iesima*

Formula equivalente:

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

Confrontare con

$$k_p = \frac{c_i - \bar{c}}{\sqrt{\bar{c}}}$$

INDICE DI DISPERSIONE DI POISSON

(UNI ENV ISO 13843:2003 Appendice A3)

“Un valore X^2 isolato è di poca importanza, specialmente se il numero di piastre parallele (n) è ridotto.

Si raccomanda di studiare un grande numero (almeno 100) di gruppi di piastre parallele su un lungo periodo di tempo.

I campioni dovrebbero rappresentare diverse fonti e stagioni”.

PROPORZIONALITÀ DEI CONTEGGI

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

PROPORZIONALITÀ DEI CONTEGGI

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

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

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

n = numero di piastre

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

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

$G^2/n-1$ - 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 di G² tramite Foglio di calcolo MICROINCERT

MD 21.05 - Veneto Agricoltura

MICROINCERT PLUS rev.2f

CONTROLLO QUALITA' ANALITICA DELLA PROVA						OMOGENEITA' CONTE				
Codice campione	Prima diluizione utile	1 ^a diluizione Piastra 1	1 ^a diluizione Piastra 2	2 ^a diluizione Piastra 1	2 ^a diluizione Piastra 2	Conteggio UFC/g-ml	G ²	Giudizio omogeneità	G ² /(n-1)	Giudizio variabilità
12892	2	3			1	8,1E+02	0,07	OK	0,01	OK
12891	2	3			1	4,4E+03	1,54	OK	0,54	OK
16959	7	34			5	3,5E+08	0,59	OK	0,59	OK
16950	1	37			5	3,8E+02	0,37	OK	0,37	OK
15022	5	206	217	16	22	2,1E+07	0,73	OK	0,24	OK
16923	5	173	173	11	20	1,7E+07	3,01	OK	1,00	Critico
1	1	13	14			1,4E+04	0,04	OK	0,04	OK
2	2	15	15	1	7	1,7E+03	10,03	Critico	3,34	Critico
0	1	117	127		12	1,2E+03	0,46	OK	0,16	OK
0	1	77	80	3	9	7,7E+02	4,07	OK	1,38	Critico
0	1	00	70	7	7	0,8E+02	1,09	OK	0,10	OK
0	3	19	23			2,1E+04	0,58	OK	0,38	OK
0	2	18	18	4	4	2,0E+03	3,90	OK	1,19	Critico
0	2	12	13	1	4	1,4E+03	3,98	OK	1,23	Critico
0	2	4	8			6,0E+02	1,38	OK	1,38	Critico
0	2	0	10			9,0E+02	0,22	OK	0,22	OK
16377	1	11				1,3E+04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16377	3	64				5,4E+04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16804	3	111				1,1E+05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16905	2	192			19	1,8E+04	0,07	OK	0,07	OK
14947	1	4				0,0E+01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10908	1	02			4	0,0E+02	0,82	OK	0,82	OK
17054	7	39			3	3,8E+08	0,21	OK	0,21	OK
15479	5	121	137	14	16	1,3E+07	1,37	OK	0,48	OK
16031	6	126	138	12	13	1,2E+07	0,17	OK	0,16	OK
17170	6	163	148	21	31	1,6E+07	13,98	NC	4,59	Critico
17149	4	94			6	2,0E+04	0,09	OK	0,09	OK
17149	3	17			1	1,8E+04	0,31	OK	0,31	OK

D.Spoloar, A.Maiello - Validazione, Incertezza di misura, Assicurazione qualità dato analitico

69

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”

Monitoraggio della validità delle prove tramite la valutazione delle prestazioni analitiche

CONTROLLO QUALITA' ANALITICA (per singolo analista) STATISTICA DEI GIUDIZI ESPRESSI TRAMITE IL TEST DEL G2

TECNICI	Numerosità giudizi				Giudizi %		
	OK	Critico	NC	TOT	OK %	Critico %	NC %
Tecnico 1	41	1	1	43	95,3%	2,3%	2,3%
Tecnico 2	0	0	0	0	-	-	-
Tecnico 3	72	1	0	73	98,6%	1,4%	0,0%
Tecnico 4	30	1	1	32	93,8%	3,1%	3,1%
Tecnico 5	8	1	0	9	88,9%	11,1%	0,0%
Tecnico 6	1	0	0	1	100,0%	0,0%	0,0%
Tecnico 7	0	0	0	0	-	-	-
Tecnico 8	0	0	0	0	-	-	-
Tecnico 9	0	0	0	0	-	-	-

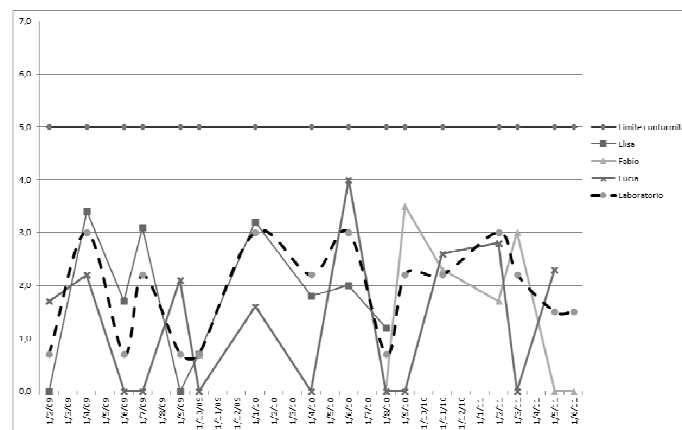
CONTROLLO QUALITA' ANALITICA (del laboratorio)

LABORATORIO	Numerosità giudizi				Giudizi %		
	OK	Critico	NC	TOT	OK %	Critico %	NC %
	152	4	2	158	96,2%	2,5%	1,3%

D.Spoloar, A.Maiello - Validazione, Incertezza di misura, Assicurazione qualità dato analitico

71

Analisi delle tendenze



D.Spoloar, A.Maiello - Validazione, Incertezza di misura, Assicurazione qualità dato analitico

72

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

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

*Valutazione dell'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 BPL (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 (par. 5.1)

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

Tab. 1 - Piastre parallele

ISO 14461-2:2005(E)
IDF 169-2:2005(E)

Colony count			Colony count			Colony count		
Upper	Lower	Sum	Upper	Lower	Sum	Upper	Lower	Sum
142	102	244	188	142	330	234	182	416
143	103	246	189	143	332	235	183	418
144	104	248	190	144	334	236	184	420
145	105	250	191	144	335	237	185	422
146	106	252	192	145	337	238	186	424
147	107	254	193	146	339	239	186	425
148	107	255	194	147	341	240	187	427
149	108	257	195	148	343	241	188	429

- Esempio. Conte: 193 e 142
- Si cerca in Tab. 1 il valore più alto dei due e si controlla che il valore della 2ª piastra sia all'interno dell'intervallo della tabella.
- In questo caso 142 non è conforme

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

Tab. 2 – diluizioni in successione

ISO 14461-2:2005(E)
IDF 169-2:2005(E)

Conte su diluizioni successive:
151 e 31.

Si cerca nella tab. 2 il valore della prima diluizione considerata (151). Si verifica se il secondo valore è compreso nell'intervallo 6 e 26 riportato nella stessa riga. In questo caso il valore 31 è al di fuori dell'intervallo (non conforme).

10^{-n}	~	$10^{-(n+1)}$	~
106	4	10,6	20
107	4	10,7	20
108	4	10,8	20

Prima dil	Diluizione successiva		
	Observed	Expected	
Sum/Count	Lower limit	Sum/Count	Upper limit
188	6	13,6	24
187	6	13,7	24
188	6	13,8	25
189	6	13,9	25
190	6	14,0	25
191	6	14,1	25
192	6	14,2	25
193	6	14,3	25
194	6	14,4	25
195	6	14,5	26
196	6	14,6	26
197	6	14,7	26
198	6	14,8	26
199	6	14,9	26
200	6	15,0	26
201	6	15,1	26
202	6	15,2	27

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 dell'applicazione del metodo



?

In ogni caso ... grazie dell'attenzione

Dino Spolaor

dino.spolaor@venetoagricoltura.org