



VALIDAZIONE METODI DI PROVA

PROVE MICROBIOLOGICHE



Il processo di validazione/qualificazione di un metodo microbiologico presuppone che i fattori critici siano adeguatamente disciplinati da indicazioni efficaci nel ridurre gli effetti indesiderati sui risultati finali.

- ✓ **la temperatura di conservazione** fino all'inizio delle prove
- ✓ **i tempi e le temperature** di incubazione
- ✓ **le prestazioni** (selettività, fertilità) dei mezzi colturali o delle prove di identificazione e /o di conferma (specificità, sensibilità), (prove di crescita, biochimiche, sierologiche, ecc.)
- ✓ **la competenza del personale** impiegato nell'esecuzione delle prove

L'efficacia delle procedure deve essere provata e documentata), (prove di crescita, biochimiche, sierologiche, ecc.)



Validazione metodi microbiologici di prova qualitativi

1. Confronto dei risultati ottenuti con il metodo da validare con i risultati ottenuti da un **metodo le cui prestazioni sono note.**
2. Prove su campioni a valore noto utilizzando o **campioni contaminati sperimentalmente** in laboratorio o campioni distribuiti nell'ambito della partecipazione a **confronti interlaboratorio.**



Raccolta e classificazione dei risultati

I dati ottenuti nella sperimentazione (non inferiore di norma a 20 prove condotte in parallelo o su campioni a valore noto) sono raccolti e classificati secondo lo schema:

Metodo	Met. Rif. (*) Valore vero	Classificazione
+	+	Positivi (P)
-	-	Negativi (N)
+	-	Falsi positivi (FP)
-	+	Falsi negativi (FN)

(*) i risultati ottenuti con il metodo di riferimento sono assimilati ai valori definiti come “valore vero” dei confronti interlaboratorio o dei campioni contaminati in laboratorio



Elaborazione

a) **Sensibilità (S)** probabilità (espressa in %) che un campione positivo risulti effettivamente tale utilizzando il metodo in esame

$$S = \frac{P}{P + FN} * 100$$

b) **Specificità (Sp)** probabilità (espressa in %) che un campione negativo risulti effettivamente tale utilizzando il metodo in esame

$$Sp = \frac{N}{N + FP} * 100$$

c) **Accuratezza (A)** grado di concordanza (espresso in %) tra il metodo di riferimento ed il metodo in esame

$$A = \frac{P + N}{P + N + FP + FN} * 100$$



Criteri di valutazione delle prestazioni del metodo

Parametro	Valore
Sensibilità (S)	≥95%
Specificità (Sp)	≥95%
Accuratezza (A)	≥95%



Di ogni serie di conte della stessa piastra viene calcolata la **media**, lo **scarto tipo** e lo **scarto tipo relativo**.

La **ripetibilità di conteggio dell'operatore** è calcolata mediante la valutazione della media quadratica degli scarti tipo relativi alle singole serie di conte .

La **ripetibilità di conteggio del laboratorio** è data dalla media quadratica della ripetibilità dei singoli operatori

RIPETIBILITA' CONTEGGIO INTRALABORATORIO	
$R_L = \sqrt{\frac{\sum_1^n (R_I)^2}{n}}$	0,026



Criteri di accettabilità ripetibilità di conteggio dell'operatore e del laboratorio

Conta effettuata su una piastra con colonie regolari di dimensioni medie, non confluenti e senza interpretazione di tipicità delle colonie. Le prestazioni dell'operatore sono considerate accettabili se:

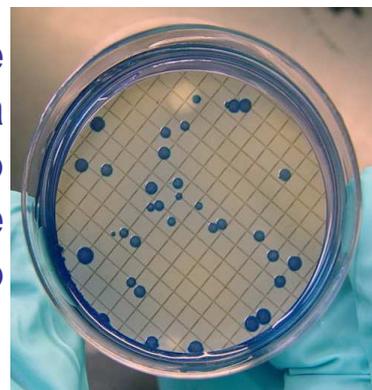
R (operatore) < 0,02



	BALLERINI		
	12		
	24	RIPETIBILITA' Op. A	
	2	<	≥
		0,02	0,02
$R_A = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n STR_A^2}{n}}$	0,016	Accettabile	

Conta effettuata con colonie confluenti o con interpretazione della tipicità delle colonie come nel caso di conteggi su terreni selettivi. Le prestazioni dell'operatore sono considerate accettabili se:

R (operatore) < 0,1



	PAFFARINI		
	21		
	42	RIPETIBILITA' Op. C	
	2	<	≥
		0,1	0,1
$R_c = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n STR_c^2}{n}}$	0,034	Accettabile	



La valutazione delle prestazioni di un metodo quantitativo che segue la distribuzione di Poisson viene fatta mediante:

1. Verifica che la **sovradispersione** dei dati osservati sperimentalmente è compatibile con la distribuzione di Poisson (verifica del grado di accordo con il modello teorico)
2. **Confronto con altro metodo**, le cui prestazioni sono note e ritenute accettabili
3. Verifica delle prestazioni del metodo in esame partecipando a **confronti interlaboratorio**



1. Validazione mediante analisi della sovradisersione dei dati osservati sperimentalmente (verifica del grado di accordo con il modello)

Espressione utilizzata per verificare il grado di accordo con il modello teorico della dispersione sperimentale dei dati:

$$\chi_{n-1}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2}{\bar{c}}$$

n	Numero delle osservazioni
c_i	Valore delle singole osservazioni
\bar{c}	Media aritmetica delle osservazioni c _i

La distribuzione dei dati è considerata **accettabile** quando:

$$(\chi_{n-1}^2) \leq \chi^2 (g.l. = n - 1)$$

con $p \geq 0,95$

dove:

$$\chi^2 (g.l. = n - 1)$$

è il valore tabellato per n-1 gradi di libertà ad una confidenza del 95%



La validazione di un metodo microbiologico attraverso l'analisi della sovradisersione si basa sull'esame dei risultati ottenuti su più repliche (almeno 2 o 3) dello stesso campione

Criteri di valutazione

- ✓ La dispersione dei dati nelle singole repliche è accettabile quando il valore del χ^2 sperimentale risulta inferiore al valore del χ^2 con g.l. = (numero repliche - 1)
- ✓ La dispersione dei dati osservata tra le singole repliche di prove indipendenti può essere valutata con la sommatoria dei singoli χ^2

$$\chi^2_{tot} = \sum_{i=1}^n \chi_i^2$$

La dispersione dei dati osservati tra le prove indipendenti comprendenti lo stesso numero di repliche è accettabile quando

$$\chi^2_{tot} \leq \chi^2 \text{ con g.l.} = (\text{numero di prove} - 1)$$

Nel caso si verificano le due condizioni si può concludere che il metodo è **idoneo** perché non modifica la naturale dispersione dei dati presente nella distribuzione di Poisson.



Verifica della proporzionalità delle diluizioni scalari

- ✓ Modello sperimentale: diluizioni scalari del campione sono esaminate con il metodo in esame.
- ✓ Sono selezionate le piastre con un numero di colonie compreso tra 15 e 300.
- ✓ La proporzionalità del metodo è valutata utilizzando la:

$$G_{m-1}^2 = 2 * \left[\sum_{i=1}^m \left(c_i \ln \frac{c_i}{R_i} \right) - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right) \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^m c_i}{\sum_{i=1}^m R_i} \right) \right]$$

c_i	Numero delle colonie rilevate nella piastra
R_i	Quantità relativa di campione inoculata alla diluizione in esame

Un metodo fornisce risultati proporzionali se la seguente espressione risulta soddisfatta

$$G_{m-1}^2 \leq \chi_{g.l}^2$$

con g.l.=n
diluizioni
esaminate – 1



Esempio:

Diluizioni esaminate	Volumi relativi	Numero colonie rilevate
Prima diluizione 10^{-3}	10	181 colonie
Seconda diluizione 10^{-4}	1	20 colonie

$$G_{m-1}^2 = 2 * \left[181 * \ln\left(\frac{181}{10}\right) + 20 * \ln\left(\frac{20}{1}\right) - (181 + 20) * \ln\left(\frac{181 + 20}{10 + 1}\right) \right] = 0,175$$



2. Validazione di un metodo per confronto dei risultati ottenuti con un metodo di riferimento le cui prestazioni sono note o ritenute accettabili.

Il processo sperimentale si basa sulla conduzione delle prove in parallelo. Devono essere condotte almeno 10 repliche.

Preliminarmente deve essere accertato che fattori esterni al metodo (es. stabilità del livello di contaminazione durante l'esecuzione delle prove) non abbiano influito in modo determinante nei risultati finali.

Per tale valutazione si utilizza l'espressione:

$$\chi_{sp}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{C})^2}{\bar{C}}$$

La dispersione dei dati risulta accettabile quando:

$$\chi_{sp}^2 \leq \chi_{g.l.=n-1}^2$$



Verificato che i dati ottenuti sperimentalmente sono compatibili con il modello statistico di Poisson le prestazioni dei due metodi vengono verificate utilizzando la seguente espressione:

$$\frac{|\bar{C}_A - \bar{C}_B|}{\sqrt{\bar{C}_A + \bar{C}_B}} \leq \frac{K_p}{\sqrt{n}}$$

\bar{C}_A	Media dei valori ottenuti con il metodo di riferimento
\bar{C}_B	Media dei valori ottenuti con il metodo da validare
n	Numero delle repliche
Kp	1,96 per p=0,95

Nel caso che la relazione sia soddisfatta i due metodi forniscono risultati sovrapponibili con una probabilità pari a p.



3. Validazione di un metodo con la partecipazione ad un confronto interlaboratorio

I risultati ottenuti con il metodo in esame vengono confrontati con i risultati ottenuti con la partecipazione ad un confronto interlaboratorio qualificato. I risultati ottenuti sono valutati utilizzando l'elaborazione fatta dal confronto interlaboratorio e sono adottati i criteri di accettabilità proposti dallo stesso.

Nel caso che il confronto interlaboratorio renda noto “il valore vero” della contaminazione del microrganismo target e lo scarto tipo ad esso collegato, la

$$\frac{|\bar{C} - \mu|}{\sqrt{\frac{\bar{C}}{n} + s_{\mu}^2}} \leq K_p$$

consente di verificare che, con la relazione soddisfatta, il metodo in sperimentazione fornisce risultati accettabili

\bar{C}	Media dei valori ottenuti con il metodo in sperimentazione
μ	Valore vero del contaminante
s_{μ}	Scarto tipo associato al valore vero
K_p	1,96 per $p=0,05$



Determinazione dei parametri sensibilità, specificità, efficienza, selettività dei metodi quantitativi con conferma

Tutte le colonie che al termine del processo di prova sono state considerate positive (appartenenti all'organismo o gruppo ricercato) e tutte le colonie assegnate come negative (e come tali non conteggiate), sono verificate con ulteriori mezzi diagnostici (altri tests biochimici, sierologici o con altri sistemi di cui sono conosciute le caratteristiche della loro prestazione).

In base ai risultati ottenuti nella prova di conferma, è possibile costruire la tabella:

Conteggi confermati	Conteggi presuntivi		
	+	-	
+	a	b	a+b
-	c	d	c+d
	a+c	b+d	n

a	Positivi confermati
b	Falsi negativi (negativi risultati positivi)
c	Falsi positivi (positivi risultati negativi)
d	Negativi confermati



$$\text{Sensibilità} = \frac{a}{a+b}$$

Frazione del totale dei positivi correttamente assegnata nella conta presuntiva

$$\text{Specificità} = \frac{d}{c+d}$$

Frazione del totale dei negativi correttamente assegnata nella conta presuntiva

$$\frac{c}{a+c}$$

Quota falsi positivi:
frazione dei positivi erroneamente assegnati

$$\frac{b}{b+d}$$

Quota falsi negativi:
frazione dei negativi erroneamente assegnati

$$\text{Efficienza} = \frac{a+d}{n}$$

Frazione delle colonie o dei tubi correttamente assegnati

$$\text{Selettività}(F) = \log\left[\frac{a+c}{n}\right]$$

Rapporto tra il log dei presunti positivi ed il numero totale delle colonie

I risultati possono essere valutati rispetto a parametri fissati dal laboratorio in funzione dei requisiti richiesti per il metodo. Indicativamente un metodo ha prestazioni elevate quando:

Sensibilità	> 0,9
Specificità	> 0,9
Efficienza	> 0,9
Selettività	> -1 inaccettabile <-2



Qualificazione di un metodo ufficiale o normalizzato

Verificare che le sue performances siano simili a quelle indicate dal metodo stesso.

I campioni di prova utilizzati devono essere rappresentativi delle matrici rientranti nel campo di applicazione del metodo stesso e le prove, dove possibile, devono essere replicate a più livelli di concentrazione batterica quando il campo di misura è superiore a due ordini di grandezza

Per i **metodi quantitativi** si procede replicando la prova per almeno 10 volte o effettuando almeno cinque prove in doppio e verificando che la **sovradispersione** dei dati osservati nelle repliche sia compatibile con il modello di distribuzione di Poisson.

Nel caso di metodi in cui sia applicabile, verificare inoltre la **proporzionalità delle diluizioni**, seguendo le modalità già descritte ai precedenti paragrafi.

Per i **metodi qualitativi** si procede replicando la prova utilizzando campioni a “valore noto” (negativi e positivi) preparati sperimentalmente in laboratorio o utilizzando campioni provenienti da confronti interlaboratorio.

Si valuta la **sensibilità e la specificità**.

In alternativa è possibile qualificare un metodo ufficiale o normalizzato anche mediante la **partecipazione a confronti interlaboratorio**.



Assicurazione qualità risultati di prova

Per tenere sotto controllo i risultati ottenuti nell'applicazione routinaria dei metodi, verranno eseguiti:

- ✓ Controllo esterno: proficiency tests
- ✓ Controllo interno: prove in doppio sullo stesso campione

Nel caso di prove in doppio, verranno eseguite su un campione preparato in laboratorio, utilizzando campioni già sottoposti ad analisi che potranno eventualmente anche essere contaminati in laboratorio, due prove in parallelo. Le prove, affidate allo stesso operatore, saranno eseguite sullo stesso campione alla stessa diluizione ed in un periodo di tempo breve (minimo necessario ad eseguire correttamente l'analisi). Per i conteggi in piastra il modello di distribuzione dei risultati da adottare è quello di Poisson. Per conteggi > 15, per il valore di Kp sperimentale che si ottiene dalla formula

$$Kp = \frac{|C1 - C2|}{\sqrt{C1 + C2}}$$

C 1 e C 2 sono i valori dei due conteggi riscontrati sulle due prove in parallelo, si potranno verificare i seguenti tre casi:

Kp < 1,96 ~ 2,0 I conteggi saranno accettabili .

Kp < 2,576 ~ 2,6 La differenza tra i due conteggi sarà considerata critica e meritevole di approfondimento

Kp > 2,6 La differenza tra i due conteggi sarà considerata anomala e sarà quindi necessario aprire una Non Conformità per valutarne le cause e le eventuali azioni correttive.

ARPA Regione Umbria	FOGLIO DI CALCOLO VALUTAZIONE PROVE IN DOPPIO MICROBIOLOGIA: Kp	MD-LAB 101 Rev. 0 10/06
---------------------	---	----------------------------

$Kp = \frac{ C_1 - C_2 }{\sqrt{C_1 + C_2}}$	C₁	C₂	Kp
	25	28	0,412081692
			ACCETTABILE

$Kp = \frac{ C_1 - C_2 }{\sqrt{C_1 + C_2}}$	C₁	C₂	Kp
	25	56	3,444444444
			NON ACCETTABILE



Per conteggi tra 0 e 15 U.F.C. è possibile riferirsi alla tab. A2 della norma ISO 7218:1996 e considerare accettabili i risultati se i valori riscontrati e sommati singolarmente rientrano nell'intervallo tabulato ovvero nessuno dei due dati è inferiore al limite minimo o superiore al limite massimo, in caso contrario sarà necessario aprire una NC per valutarne le cause e le eventuali azioni correttive.

Per le prove in doppio eseguite invece per i metodi qualitativi, è necessario che ci sia corrispondenza dei risultati ottenuti nelle due prove (es. entrambi positivi o entrambi negativi).

I controlli di qualità esterni vengono realizzati attraverso la partecipazione a proficiency tests che forniscono al laboratorio un'indicazione qualitativa sulle proprie performances e aiutano ad evidenziare i possibili errori sistematici.



I controlli sia interni che esterni oltre a darci un'indicazione in tempo reale dell'andamento del metodo in uso, attraverso la loro graficizzazione,

permettono anche di monitorare il trend dei risultati analitici per programmare eventuali azioni correttive. In particolare, si realizzano kp chart, per le prove in doppio

ARPA UMBRIA

KP CHART

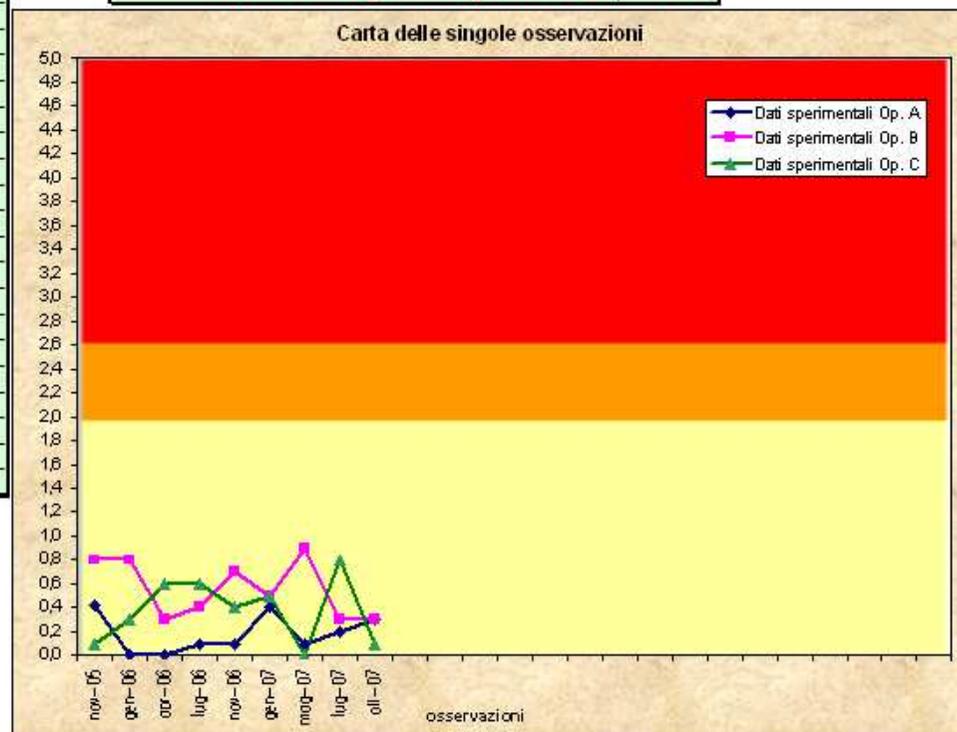
MD-LAB 75
Rev. 0
Data: 01/08
pag. 1 di 1

Documento di riferimento: IO-LAB 13

N	PROVE IN DOPIO	Data	Xi (Op. A)	Xi (Op. B)	Xi (Op. C)
1	8385-8388-8391	nov-05	0,4	0,8	0,1
2	569-572-575	gen-06	0,0	0,8	0,3
3	2573-2574-2575	apr-06	0,0	0,3	0,6
4	5177-5461-5180	lug-06	0,1	0,4	0,6
5	8187-8190-8193	nov-06	0,1	0,7	0,4
6	254-255-256	gen-07	0,4	0,5	0,5
7	2878-2742-2770	mag-07	0,1	0,9	OK*
8	5106-5103-5109	lug-07	0,2	0,3	0,8
9	7668-7669-7670	ott-07	0,3	0,3	0,1
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					

Misurando	STREPTOCOCCI FECALI ed ENTEROCOCCI
Matrice	ACQUA SUPERFICIALE E REFLUA
Metodo di prova	APAT CNR IRSA 7040 C Man 29 2003

Carta X_o delle Singole Osservazioni	
Linea di Azione superiore = LAs	2,6
Linea di Sorveglianza superiore = LSS	2,0



Operatori	
Operatore A	BALLERINI ENRICA
Operatore B	LANCIONI TISZA
Operatore C	PAFFARINI ANNA

* Valori che rientrano nei limiti di confidenza al 95% (Tab. A2 ISO 7218:1996)



ARPA UMBRIA

Z-SCORE CHART

MD-LAB 76
Rev. 0
Data: 01/08
pag. 1 di 1

Documento di riferimento: IO-LAB 13

e z-score chart, per i proficiency tests.

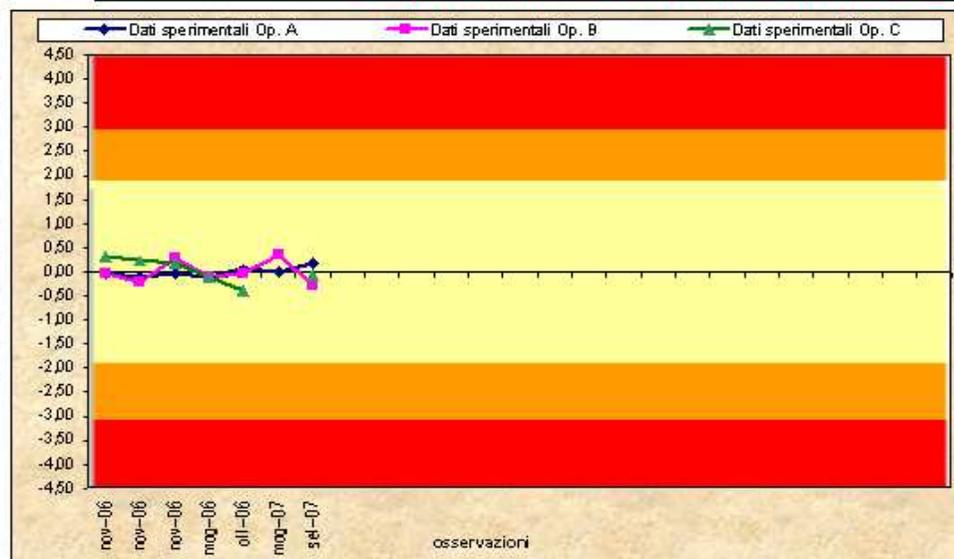
N	CIRCUITO INTERLABORATORIO	Data	\bar{X}_i (Op. A)	\bar{X}_i (Op. B)	\bar{X}_i (Op. C)
1	SENATE-W1-05-091	nov-06	-0,03	-0,05	0,31
2	SENATE-W1-05-092	nov-06	-0,1	-0,2	0,23
3	SENATE-W1-05-093	nov-06	-0,05	0,3	0,16
4	QM Acqua superf.	mag-06	-0,12	-0,12	-0,12
5	QM Acqua superf.	ott-06	0,05	-0,05	-0,38
6	QM Acqua superf.	mag-07	0	0,34	
7	QM Acqua superf.	set-07	0,19	-0,27	-0,07
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					

Operatori	
Operatore A	BALLERINI ENRICA
Operatore B	LANCIONI TISZA
Operatore C	PAFFARINI ANNA

Misurando	STREPTOCOCCHI FECALI ED ENTEROCOCCHI
Matrice	ACQUA SUPERFICIALE
Metodo di prova	APAT CNR IRSA 7040 C Mar 29 2003

Carta X o delle Singole Osservazioni

Linea di Azione inferiore (+3 del valore assegnato) = LA_s 3,00
 Linea di Sorveglianza superiore (+2 del valore assegnato) = LS_s 2,00
 Linea di Sorveglianza inferiore (-2 del valore assegnato) = LS_i -2,00
 Linea di Azione inferiore (-3 del valore assegnato) = LA_i -3,00



Annualmente i risultati dei controlli vengono valutati globalmente per evidenziare eventuali problemi. In questa occasione si esegue un riesame della validazione /qualificazione del metodo e sulla base della valutazione globale dei controlli e/o a seguito di variazioni o modifiche della strumentazione utilizzata, delle procedure applicate ecc., si considera la necessità o meno di procedere a programmare una rivalidazione/ riquilificazione.