



SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPa:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori



UNI EN ISO 7218:2007

Microbiologia di alimenti e mangimi per animali

Requisiti generali e guida

per le analisi microbiologiche

elementi innovativi e conseguenti criticità

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accredimento dei laboratori

TEMPI DI ADEGUAMENTO

al 30 novembre 2008

(dopo 12 mesi dall'emanazione della norma UNI EN ISO 7218 -22/11/2007)

i laboratori avrebbero almeno dovuto:

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

TEMPI DI ADEGUAMENTO

inserire la norma, ove pertinente e applicabile,
nei documenti di riferimento del SGQ del laboratorio

approntare un piano di adeguamento alla norma trattando
dettagliatamente i diversi punti e, in particolare, l'espressione
dei risultati e l'incertezza di misura.

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

La norma UNI EN ISO 7218:2007 comprende almeno 6 argomenti rilevanti, ciascuna delle quali meriterebbe chiarimenti per supportare i laboratori:

Punto 3 – organizzazione strutturale del laboratori

Punto 4 – personale: competenza e sua verifica
(riferimento a ISO 14461-1 e -2)

Punto 5 - strumentazione: caratteristiche metrologiche
(termometri, termostati, autoclavi, micropipette, ecc.)

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

Punti 10.3, 10.4 e 10.5: calcolo ed espressione dei risultati
prove quantitative

Punto 10.3.2.6: incertezza di misura prove quantitative su
terreni solidi:
ISO/TS 19036:2006 + Amd1:2009

Punto 15: assicurazione della qualità dei risultati e controllo
della performance

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

Punti che riteniamo di maggior incidenza:

5. *Strumentazione: caratteristiche metrologiche*
10. *Calcolo ed espressione dei risultati*
10. *Stima dell'incertezza di misura*
15. *Assicurazione della qualità dei dati e controllo della performance*

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

Strumentazione: caratteristiche metrologiche

5.8 incubatori

5.8.4 verifica della stabilità e dell'uniformità della temperatura
in tutto il volume di lavoro dell'incubatore con restrizione del campo di utilizzo
sulla base dei dati ottenuti
da tali misurazioni

5.27 misuratori di volumi

5.27.3 verifica prima della messa in uso e a intervalli regolari
dell'errore di erogazione
(UNI EN ISO 8655-1 – ISO 835)
esecuzione di verifiche intermedie

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

Strumentazione: caratteristiche metrologiche

5.28 misuratori di temperatura

5.28.2 utilizzare misuratori di temperatura (termometri, datalogger)
con incertezza pari a 1/4 dell'errore massimo permesso

5.28.3 i termometri di riferimento devono essere tarati prima della messa in uso
e almeno ogni 5 anni su tutto il range di utilizzo; eseguire verifiche intermedie
mediante il controllo di un singolo punto di taratura (ad es: il punto di
congelamento)

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accredimento dei laboratori

Calcolo ed espressione dei risultati

10.2.2 numero di piastre per diluizione:
per laboratori che operano in conformità con la norma ISO 17025, utilizzare una piastra per diluizione (almeno due diluizioni)

Questo paragrafo è in corso di riformulazione con la menzione anche della piastra doppia **nell'ambito dell'amendment alla norma che è in progetto** (Valencia resolution – Maggio 2009- ISO TC34 SC9- n° 381)

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

Calcolo ed espressione dei risultati

10.3.2.2 in generale per procedere al calcolo è necessario che almeno una piastra contenga **10 colonie**



UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

*Assicurazione della qualità dei dati e
controllo performance*

15.1 *valutazione continua attraverso controllo interno*

- campioni contaminati artificialmente
- campioni contaminati naturalmente costituiti da matrici diverse
- materiali di riferimento
- replica di campioni
- valutazione replicata di risultati dei test

intervallo del controllo: in funzione della tipologia di prova e della frequenza applicazione

15.3 *partecipazione a proficiency testing*

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

Stima dell'incertezza di misura

APPROFONDIMENTO

ISO/TS 19036:2006 + Amd1:2009

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

Sanguolo Angela
Stefanetti Mariavittoria

Roma, 25 - 26 giugno 2009

12

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

Campo di applicazione della norma

prodotti destinati al consumo umano ed animale

campioni ambientali

(aree di produzione e manipolazione di alimenti)

*non applicabile a:
MPN (terreni liquidi)
prove qualitative*

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

ISO/TS 19036:2006 + Amd1:2009
stima dell'incertezza di misura

In generale MU è uguale a $k \times SR$ dove:

K è il fattore di copertura

(pari a 2 al quale corrisponde un livello di confidenza di circa il 95%)

S_R lo scarto tipo di riproducibilità

Recentemente con Amd1:2009 si è introdotto un fattore di correzione che tiene conto della componente dovuta alla distribuzione di Poisson e permette l'applicazione del calcolo di **MU anche ai conteggi "low"**

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

per la stima di S_R individua 3 possibili modalità:

- 1) S_R determinato da prove intralaboratorio
- 2) S_R riportato dal metodo e calcolato attraverso uno studio interlaboratorio
- 3) S_R ricavato da circuiti valutativi interlaboratorio (interlaboratory proficiency trial)

La modalità 1 è indicata come preferenziale

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

Le regole generali (par. 4.4) sono:

È necessario determinare S_R per:

ogni microrganismo
(o gruppi consistenti di microrganismi)

ogni matrice
(o gruppi consistenti di matrici)

metodo applicato nel laboratorio

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

Le regole generali (par. 4.4) sono:

La misura dell'incertezza (MU):

è correlata ad un dato ottenuto in specifiche condizioni
(operatori, apparecchiature, reagenti, ecc)

non è caratteristica di un metodo analitico di per sé
(legame metodo-laboratorio)

Il laboratorio deve dimostrare di avere sotto controllo le principali componenti
dell'incertezza
(terreni di coltura, tecniche di conteggio ecc.)

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

Attualmente i laboratori sono orientati,
ad applicare prevalentemente l'approccio 1

Difficoltà nella definizione del protocollo sperimentale
che deve comprendere:

tutte le matrici analizzate dal laboratorio
almeno 10 campioni per matrice (o tipo di matrice)
campioni contaminati naturalmente, **se possibile**
ripetizione sullo stesso campione variando le condizioni operative
(personale, reagenti, strumenti, materiali, ecc)

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori
Considerazioni sull'approccio 2

Pochi metodi contengono il valore di S_R determinato tramite studio interlaboratorio

ISO 7932 *B. cereus*

ISO 7937 *C. perfringens*

ISO 6888-1 e ISO 6888-2 *Stafilococchi coagulasi positivi*

ISO 11290-2 *L. monocytogenes*

Il valore dello scarto tipo di riproducibilità così calcolato diventa un **valore fisso uguale per tutti i laboratori e per tutte le matrici** comprese nel campo di applicazione del metodo stesso
l'apporto della matrice e del sottocampionamento dipendono dal disegno sperimentale

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

Considerazioni sull'approccio 3

Si utilizza il valore di scarto tipo target del circuito.
MU diventa un valore fisso uguale per tutti i laboratori e per tutte le matrici coperte dal circuito.

Il valore di incertezza **MU** così calcolato non tiene conto del sottocampionamento e della eterogeneità della matrice.

Esempio: circuito QM lo scarto tipo per la quasi totalità dei parametri è uguale a 0,35
quindi **MU = 0,70**

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

***La conclusione è che la coerenza
con le regole generali del punto 4 si
ritrova solo nell'approccio 1
rigoroso, che utilizza cioè matrici
naturalmente contaminate***

Tale approccio è molto laborioso e di difficile praticabilità

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

PROPOSTA APPLICATIVA
Utilizzo del materiale dei circuiti valutativi interlaboratorio

approfondire la possibilità di stima dell'incertezza di misura con un approccio 1 semplificato che preveda l'utilizzo del materiale dei circuiti valutativi interlaboratorio per l'esecuzione delle prove sperimentali

per almeno le seguenti ragioni:

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

- a) *il laboratorio, spesso, non dispone di campioni positivi da utilizzare per effettuare le prove previste e quindi dovrà utilizzare campioni contaminati artificialmente*
- b) *il laboratorio partecipa regolarmente a circuiti interlaboratorio e quindi dispone dei relativi dati*
- c) *alcuni laboratori pubblici sono multisito e quindi tendono a valutare una possibile stima dell'incertezza "globale" ovviamente a parità di metodo*

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

PROPOSTA APPLICATIVA
Utilizzo del materiale dei circuiti valutativi interlaboratorio

Perché tale approccio è proponibile
anche se i campioni in questione sono spesso
dei liofilizzati a matrice alimentare generica ?

perché tali matrici sono sostanzialmente assimilabili a quelle contaminate
artificialmente

*(previste dalla norma per l'approccio 1:
 S_R determinato da prove intralaboratorio)*

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

PROPOSTA APPLICATIVA
Utilizzo del materiale da circuiti valutativi interlaboratorio

Infatti le matrici derivanti dai circuiti proficiency testing contengono, oltre al microrganismo target, anche una flora microbica associata e una componente solida alimentare (es. farina di avena)

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditemento dei laboratori

PROPOSTA APPLICATIVA
Utilizzo del materiale da circuiti valutativi interlaboratorio

Il valore di incertezza **MU** così calcolato non tiene conto del **sottocampionamento e della eterogeneità della matrice** .

Il valore dell'incertezza così calcolato tuttavia, derivando da proficiency testing ove il laboratorio rispetta i criteri di accettabilità del circuito, garantisce che la bias del laboratorio stesso sia sotto controllo.

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

INFINE

Non è possibile nell'affrontare il problema dell'incertezza di misura nelle prove microbiologiche non rimarcare che una componente importante di tale incertezza è legata al sottocampionamento e alla preparazione della diluizione primaria

Le norme della serie ISO 6887 disciplinano l'argomento per gli aspetti generali e per gli aspetti specifici di matrice

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

Attualmente è in corso la revisione delle norme ISO 6887 (Valencia resolution – Maggio 2009- ISO TC34 SC9- n° 393) .

Si prevede di includere protocolli puntuali per la preparazione della porzione di prova allo scopo **dichiarato** di diminuire la componente dell'incertezza dovuta al sottocampionamento

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

CHIARIMENTI NECESSARI

estensione della norma ISO/TS 19036:2006 alle acque?

*la ISO 8199 “Water quality” è citata in bibliografia e
puntualmente al capitolo 10.2.2.*

Ci pare si tratti di un richiamo non sostanziale.

*La ISO/TS 19036 nelle tabelle relative all’AnnexA riporta tra
le matrici sperimentate anche l’acqua (tab A.1, Tab A.5).*

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

CHIARIMENTI NECESSARI

la norma ISO/TS 19036:2006
è applicabile a tutte le prove sulle superfici
intesi come *tamponi e piastre da contatto* ?

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

PARERI AUTOREVOLI

*Il Sinal
nel corso dell'incontro 2008
con i laboratori accreditati
si è così espresso:*

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

Sanguolo Angela
Stefanetti Mariavittoria

Roma, 25 - 26 giugno 2009

31

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

PARERI AUTOREVOLI

“La matrice acqua benché non contemplata nella UNI EN ISO 7218:2007, è citata nel campo di applicazione della ISO TS 19036:2006 (prodotti destinati al consumo umano)... Tuttavia essendo vigenti norme specifiche applicabili alle acque (UNI EN ISO 8199, UNI 10674, UNI EN ISO 13843), il laboratorio può scegliere quale tipo di approccio utilizzare per la stima dell’incertezza di misura ”

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche

SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APPA:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori

PARERI AUTOREVOLI

“La ISO TS 19036:2006 è applicabile alle prove sulle superfici nel caso si utilizzino i tamponi, assimilabili alla categoria degli alimenti liquidi (trasporto in soluzione tampone oggetto poi di prova); per le piastre da contatto è poco proponibile”

UNI EN ISO 7218:2007
Microbiologia di alimenti e mangimi per animali
Requisiti generali e guida
per le analisi microbiologiche



SEMINARIO
Il Sistema ISPRA/ARPA/APP:
Materiali di riferimento, Armonizzazione di metodi
ed Accreditamento dei laboratori



UNI EN ISO 7218:2007

Microbiologia di alimenti e mangimi per animali

Requisiti generali e guida

per le analisi microbiologiche

elementi innovativi e conseguenti criticità