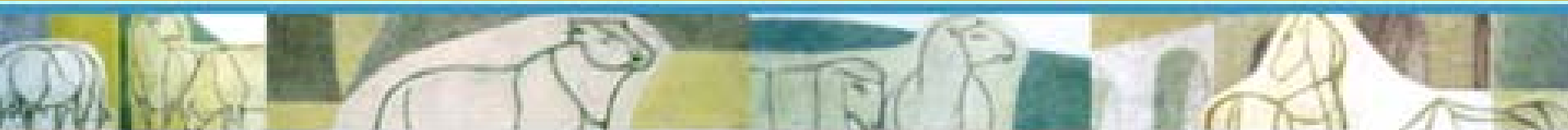




Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# Standard internazionali e principi di validazione

Laura De Santis



# NORMA : DEFINIZIONE

Secondo il Regolamento UE 1025 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2012 sulla normazione europea, per “norma” si intende:

*"specifica tecnica, adottata da un organismo di normazione riconosciuto, per applicazione ripetuta o continua, alla quale non è obbligatorio conformarsi, e che appartenga a una delle seguenti categorie: norma internazionale, norma europea, norma armonizzata, norma nazionale"*

# NORME E LEGGI

**SEBBENE L'APPLICAZIONE DELLE NORME TECNICHE SIA VOLONTARIA QUANDO QUESTE SONO RICHIAMATE IN PROVVEDIMENTI LEGISLATIVI PUO' INTERVENIRE UN CARATTERE DI COGENZA .**

**ES. DIRETTIVE EUROPEE CHE DEFINISCONO I REQUISITI DI SICUREZZA DEI PRODOTTI .**

**I PRODUTTORI POSSONO LIBERAMENTE SCEGLIERE COME RISPETTARE I REQUISITI MA SE LO FANNO ADOTTANDO LE NORME TECNICHE EUROPEE ARMONIZZATE (\*) BENEFICIANO AUTOMATICAMENTE DELLA PRESUNZIONE DI CONFORMITA' E POSSONO CIRCOLARE LIBERAMENTE SUL MERCATO EUROPEO**

(\*) norme elaborate dal CEN su richiesta della Commissione Europea e citate dalla Gazzetta Ufficiale

# ENTI DI NORMAZIONE

## ISO: International Standard for Standardization

QUESTE NORME SONO UN RIFERIMENTO APPLICABILE A LIVELLO INTERNAZIONALE. OGNI PAESE PUO' DECIDERE SE RAFFORZARNE IL RUOLO ADOTTANDOLE COME PROPRIE (NEL QUAL CASO IN ITALIA LA SIGLA DIVENTA **UNI-ISO** OPPURE **UNI EN ISO** SE RECEPITE ANCHE A LIVELLO EUROPEO)

**EN** : IDENTIFICA LE NORME ELABORATE DAL CEN (COMITATO EUROPEO DI NORMAZIONE) LE NORME EN DEVONO ESSERE OBBLIGATORIAMENTE RECEPITE DA I PAESI MEMBRI DELLA COMUNITA' EUROPEA (IN TAL CASO IN ITALIA LA SIGLA DIVENTA **UNI EN** )

**UNI** : ENTE ITALIANO DI NORMAZIONE. ESPLICA LA SUA ATTIVITA' IN TUTTI I SETTORI AD ECCEZIONE DI QUELLO Elettrotecnico ED ELETTRONICO DI COMPETENZA DEL **CEI** ( Comitato Elettrotecnico Italiano)

---

**IEC** : ORGANIZZAZIONE INTERNAZIONALE PER LA DEFINIZIONE DI STANDARD IN MATERIA DI ELETTRICITA', ELETTRONICA E TECNOLOGIE CORRELATE. MOLTI DEI SUOI STANDARD SONO DEFINITI IN COLLABORAZIONE CON L'ISO (*Organizzazione Internazionale per la normazione*).

# ACCREDITAMENTO

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana è accreditato da ACCREDIA secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura.

L'accreditamento dell'Istituto è un riconoscimento formale da parte di un Ente terzo (ACCREDIA) per la sua competenza ad eseguire specifiche prove.

# ***CRITERI DI VALIDAZIONE PCR QUALITATIVA***

## **PG MIC 004: VALIDAZIONE E VERIFICA DEI METODI MOLECOLARI PER L'ANALISI DEGLI ALIMENTI**

IN PRESENZA DI METODI DI RIFERIMENTO : secondo ISO 16140: 2003 (\*):  
Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods.

IN ASSENZA DI METODI DI RIFERIMENTO : secondo ISO 22118: 2011:  
Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for detection and quantification of food borne pathogens- Performance characteristics.

(\*) ATTUALMENTE E' IN VIGORE LA ISO 16140 : 2016

# ***CRITERI DI VALIDAZIONE PCR QUALITATIVA***

**SENSIBILITA' : PROBABILITA' DI OTTENERE UN RISULTATO POSITIVO IN PRESENZA DI UN ANALITA (  $N^{\circ}$  POSITIVI correttamente classificati /  $N$  campioni contenenti l'analita )**

**SPECIFICITA' : PROBABILITA' DI OTTENERE UN RISULTATO NEGATIVO IN ASSENZA DI ANALITA (  $N^{\circ}$  NEGATIVI correttamente identificati /  $N^{\circ}$  campioni non contenenti l'analita )**

**OVERALL ACCURACY (ESATTEZZA COMPLESSIVA); PROBABILITA' DI OTTENERE UN RISULTATO CORRETTO (  $N^{\circ}$  campioni correttamente identificati /  $N^{\circ}$  totale dei campioni )**

RIVITALIZZAZIONE CEPPA MICOBICO



ALLESTIMENTO DILUIZIONI



SEMINA SU TERRENO IN PIASTRA



INCUBAZIONE DELLE PIASTRE CONTA  
DELLE ufc



SELEZIONE DELLE DILUIZIONI CHE  
HANNO PRODOTTO UN NUMERO  
PROSSIMO AL LOD E 10 VOLTE IL LOD



INOCULO NEL BRODO DI  
ARRICCHIMENTO CONTENENTE LA  
MATRICE DI INTERESSE



INCUBAZIONE DELLA BRODOCOLTURA



ESECUZIONE DELLE REPLICHE PCR

1) 10 REPLICHE IN DUPLICATO  
DEI LIVELLI :  
Lo (matrice non contaminata)-  
L1 (LOD) - L2 (10VOLTE IL LOD)



VALUTAZIONE RISULTATI (SENSIBILITA'-  
SPECIFICITA'- OVERALLACCURACY)



**ESEMPIO : N° 100 CAMPIONI DI CUI 70 POSITIVI E 30 NEGATIVI**

**ESITI OTTENUTI :**

**N° 67 CAMPIONI CORRETTAMENTE IDENTIFICATI COME POSITIVI ( VERI POSITIVI – VP);**

**N° 3 CAMPIONI ERRONEAMENTE IDENTIFICATI COME NEGATIVI (FALSI NEGATIVI –FN);**

**N° 28 CAMPIONI CORRETTAMENTE IDENTIFICATI COME NEGATIVI (VERI NEGATIVI-VN);**

**N° 2 CAMPIONI ERRONEAMENTE IDENTIFICATI COME POSITIVI (FALSI POSITIVI –FP)**

		REALTA'	
		+	-
PCR	+	67 (VP)	2 (FP)
	-	3 (FN)	28 (VN)
		70	30

$$\text{SENSIBILITA'} = ( 67/70 ) * 100 = 95,71 \% \\ (\text{VP} / \text{VP}+\text{FN})$$

$$\text{SPECIFICITA'} = ( 28/30 ) * 100 = 93,33 \% \\ (\text{VN}/\text{VN}+\text{FP})$$

$$\text{OVERALL ACCURACY} = ( 67+28/100 ) * 100 = 95\% \\ (\text{VP}+\text{VN}/\text{Tot. campioni})$$

## ***CALCOLO DELL'INTERVALLO DI CONFIDENZA ASSOCIATO AL NUMERO DI CAMPIONI ESAMINATI (1)***

UNA VOLTA CALCOLATE SENSIBILITA' –SPECIFICITA' E ACCURATEZZA IN PERCENTUALE (p) E' NECESSARIO CALCOLARE L'INTERVALLO DI CONFIDENZA ASSOCIATO A CIASCUN PARAMETRO

PER VALORI  $10 \leq (p) \leq 90$  APPLICARE LA SEGUENTE FORMULA:

$$CI (95\%) = p \pm 2 \sqrt{[p(1-p)/n]}$$

ESEMPIO: ACCURATEZZA DETERMINATA SU 20 REPLICHE PARI A 70 %

$$(p = 0,70 \quad n = 20)$$

$$CI (95\%) = 0,70 \pm 2 \sqrt{[0,70(1-0,70)/20]} = 0,70 \pm 0,205$$

(Limite max interv. di conf. = 90,5% - Limite min. interv. di conf = 49,5 %)

## ***CALCOLO DELL'INTERVALLO DI CONFIDENZA ASSOCIATO AL NUMERO DI CAMPIONI ESAMINATI (2)***

PER VALORI DI  $(p) \geq 90$  CALCOLARE SOLO IL LIMITE INFERIORE DELL'INTERVALLO DI  
CONFIDENZA UTILIZZANDO LA TABELLA

ESEMPIO :

ACCURATEZZA = 94 % OTTENUTA  
SU 20 REPLICHE

$(P) = 0,94$   $n = 20$

VALORE TABULATO 0,88

LIVELLO MINIMO INTERVALLO DI  
CONFIDENZA = 88%

	n		
P	10	20	30
0,90	0,75	0,83	0,82
0,92	0,85	0,83	0,85
0,94	0,85	0,88	0,88
0,96	0,85	0,93	0,92
0,98	0,95	0,93	0,95
0,99	0,95	0,98	0,98

## TEST DI VALUTAZIONE DEI RISULTATI DISCORDANTI

		METODO DI RIFERIMENTO	
		POSITIVO (R +)	NEGATIVO (R-)
METODO ALTERNATIVO	Positivo	+ / + CONCORDANZA RISULTATO POSITIVO (PA)	- / + DEVIAZIONE POSITIVA (PD) Met. Rif ( - ) - Met. Alt.(+)
	Negativo	- / + DEVIAZIONE (ND) Met. Rif ( + ) - Met. Alt.(-)	- / - CONCORDANZA RISULTATO NEGATIVO (NA)

SOMMA DELLE DEVIAZIONI

$$Y = PD + ND$$

ESEMPIO: PD = 2 ND = 10

$$Y = 2 + 10 = 12$$

m = valore più piccolo tra le due deviazioni = 2

CONFRONTO DEL VALORE (m) CON IL VALORE TABULATO (M)

PER IL VALORE DI Y = 12

SE  $m \leq M$  I DUE METODI SONO DIVERSI

# ***SELETTIVITA' DEL METODO***

***VIENE VALUTATA ATTRAVERSO L'INCLUSIVITA' E  
L'ESCLUSIVITA'***

- INCLUSIVITA' : CAPACITA' DEL METODO DI INDIVIDUARE L'ANALITA TARGET ALL'INTERNO DI UNA VARIETA' DI CEPPI***
- ESCLUSIVITA': CAPACITA' DEL METODO DI NON SUBIRE INTERFERENZE DA PARTE DI CEPPI NON SPECIFICI***
- SELEZIONARE ED ANALIZZARE CON IL METODO ALTERNATIVO :***
  - 10 COLTURE PURE DEL MICRORGANISMO TARGET ;***
  - 10 COLTURE DI MICRORGANISMI NON-TARGET SCELTI TRA QUELLI CHE POTREBBERO CAUSARE INTERFERENZA CON IL MICRORGANISMO BERSAGLIO OPPURE RAPPRESENTATIVI DELLA FLORA CONTAMINANTE DEGLI ALIMENTI UTILIZZATI NELLA VALIDAZIONE***

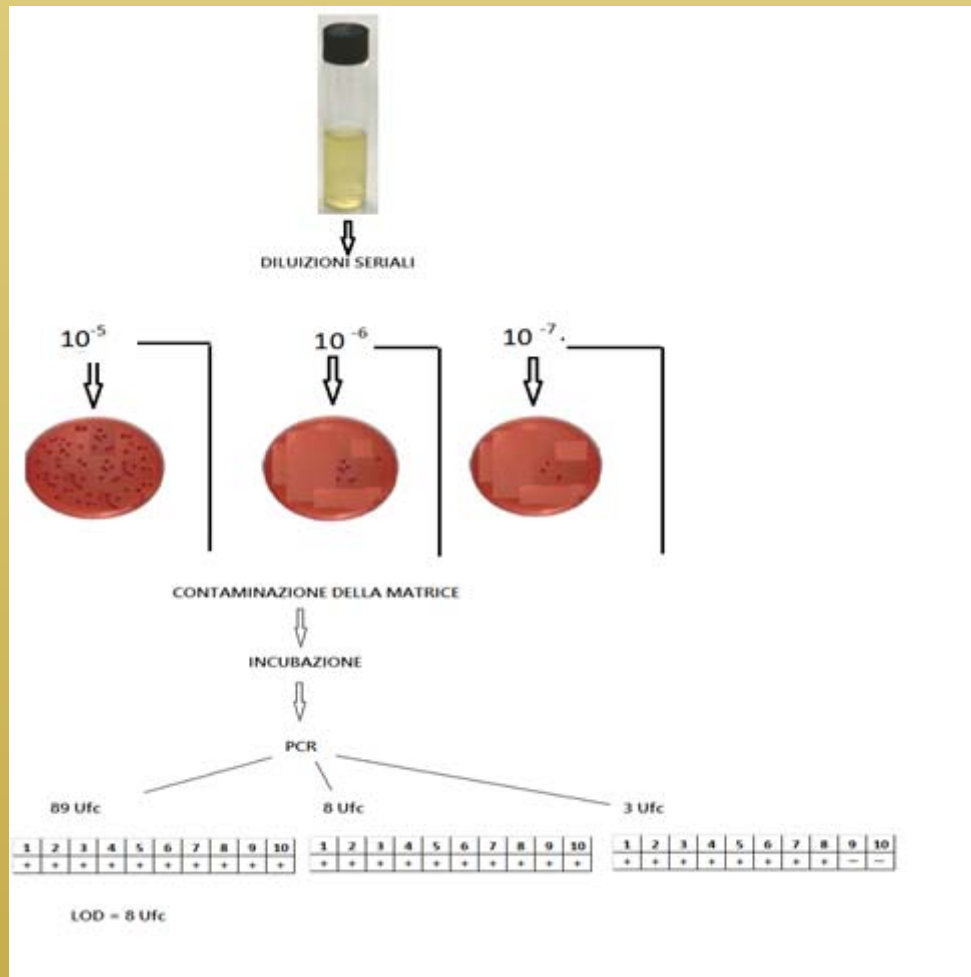
***ACCORDANZA PROBABILITA' PERCENTUALE DI TROVARE  
LO STESSO RISULTATO (POSITIVO O NEGATIVO) TRA  
IDENTICI CAMPIONI DI PROVA ANALIZZATI IN CONDIZIONI  
DI RIPETIBILITA'***

***CONCORDANZA : PROBABILITA' PERCENTUALE DI  
TROVARE LO STESSO RISULTATO (POSITIVO O NEGATIVO)  
TRA IDENTICI CAMPIONI DI PROVA ANALIZZATI IN  
LABORATORI DIVERSI -  
(VALUTABILE ATTRAVERSO PARTECIPAZIONE A CIRCUITI  
INTERLABORATORIO)***

**LOD (LIMIT OF DETECTION):** minima quantità o concentrazione di analita che può essere rilevata in modo affidabile, ma non necessariamente quantificata.

**VERIFICA DEL LOD : PROVE QUALITATIVE PCR (PRESENZA /ASSENZA )  
MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI**

*LOD : CONCENTRAZIONE MINIMA  
(Espressa in Unità formanti colonia-  
Ufc) ALLA QUALE SI OTTIENE UN  
SEGNALE IN ALMENO IL 95% DEI  
REPLICATI DI PROVA (per n=20 )  
oppure NEL 100 % (per n= 10).*



**LOD (LIMIT OF DETECTION): MINIMA CONCENTRAZIONE DI ANALITA A LIVELLO DELLA QUALE SI OTTIENE SEGNALE IN ALMENO IL 95% DEI REPLICATI DI PROVA**

**Occorre allestire una serie di diluizioni del DNA bersaglio in acqua fino a bassi numeri di copie.**

**Essendo impossibile condurre 100 replicati per ogni livello del target, una semplificazione consiste nel fare 20 replicati ed individuare la prima diluizione in cui compare un negativo (1/20 = 5 % FN).**

**Oppure eseguire 10 replicati per ciascun livello restringendo i requisiti di positività al 100 %.**

**LOD =67**

COPIE DNA BERSAGLIO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
67	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+



# ***PCR QUANTITATIVA PARAMETRI DI VALIDAZIONE***

- ***SENSIBILITA'***
- ***SPECIFICITA'***
- ***ACCURATEZZA :***
  - ***Ripetibilità- Riproducibilità***
  - ***Esattezza***
- ***ROBUSTEZZA***
- ***EFFICIENZA – LINEARITA'***
- ***LOD (Limit of Detection)***
- ***LOQ (Limit of Quantification)***
- ***INCERTEZZA DI MISURA***

**EFFICIENZA**

$$E = \left( \frac{1}{10 \cdot \text{slope}} \right) - 1$$

$$\text{Slope} = 3,32 \quad E = 100 \%$$

**LINEARITA' (IL SEGNALE E' PROPORZIONALE ALLA CONCENTRAZIONE DEL MISURANDO)**

$$r^2 \text{ ( Goodness of fit )}$$

**PRECISIONE** : grado di accordo tra risultati analitici indipendenti ottenuti in condizioni definite . VIENE VALUTATA ATTRAVERSO LA DEVIAZIONE STANDARD SEMPLICE ( $\sigma$ ) O RELATIVA RSD (coeff. di variazione)

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Sr = scarto tipo Ripetibilità  
SR = scarto tipo Riproducibilità

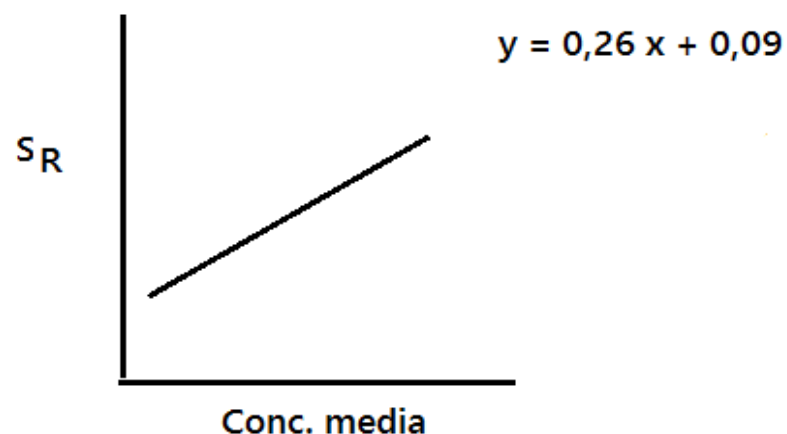
$$CV = \frac{\sigma}{\mu}$$

**ESATTEZZA** : grado di accordo tra il valore medio ottenuto da un'ampia serie di risultati di prova ed il valore di riferimento accettato

$$\text{BIAS ASS} = V \text{ medio} - V \text{ rif}$$

$$\text{BIAS \%} = \frac{\text{BIAS ASS}}{V \text{ rif}} \times 100$$

# STIMA DELL' INCERTEZZA DI MISURA, LOD E LOQ MEDIANTE PARTECIPAZIONE A COLLABORATIVE TRIAL (\*)



$S_R$  = Deviaz. st. Riproducibilità

slope = 0,26 (RSU)

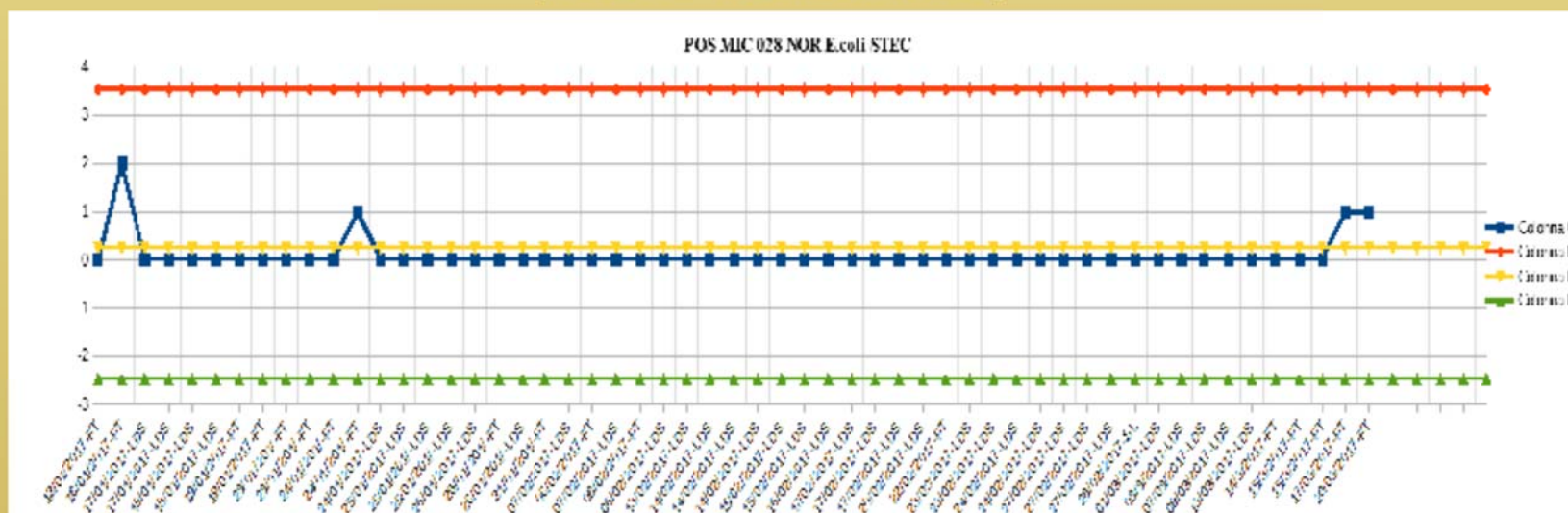
intercetta = 0,09 ( $\mu_0$ )

$$LOD = \frac{4 \mu_0}{1 - 4 RSU^2}$$

$$LOQ = \sqrt{\frac{\mu_0^2}{RSU_{max} - RSU^2}}$$

(\*) Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories

## UTILIZZO DELLA CARTA DI CONTROLLO PER ATTRIBUTI (PROVE QUALITATIVE)



D.O. CONTROLLO ALIMENTI IL MIC LTV 002 rev	CARTA DI CONTROLLO	POS MIC 028 NOR rev	ANNO	2017	Pg 1 di	.....
STRUMENTO	DATA- OPERATORE	n° non conformi	LCSu	u	LICu	Target non conforme
ROTORGENE	03/01/2017-LDS	0				
STRATAGENE	13/01/2017-FT	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	16/01/2017-FT	2	3.53	0.24	-2.46	0157,026
ROTORGENE	17/01/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	
ROTORGENE	17/01/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	
ROTORGENE	18/01/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	
ROTORGENE	18/01/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	
ROTORGENE	19/01/2017-FT	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	19/01/2017-FT	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	23/01/2017-FT	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	23/01/2017-FT	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	24/01/2017-FT	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	24/01/2017-FT	1	3.53	0.24	-2.46	0111
ROTORGENE	24/01/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	
ROTORGENE	25/01/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	25/01/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	25/01/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	
ROTORGENE	26/01/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	26/01/2017-FT	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	26/01/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	31/01/2017-FT	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	07/02/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	
ROTORGENE	06/02/2017-FT	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	07/02/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	
STRATAGENE	08/02/2017-FT	0	3.53	0.24	-2.46	
ROTORGENE	06/02/2017-LDS	0	3.53	0.24	-2.46	

Carte  $u$  = numero di caratteristiche non conformi  
con un campione di numerosità variabile

$\bar{u}$  =  $\frac{\text{totale di caratteristiche non conformi}}{\text{totale unità ispezionate}}$

$$LSC_u^{(*)} = \bar{u} + 3\sqrt{\bar{u}} / \sqrt{n}$$

$$LIC_u^{(*)} = \bar{u} - 3\sqrt{\bar{u}} / \sqrt{n}$$

....PER QUANDO ?



DOBBIAMO VALIDARE 13  
METODI



IERI !!!!

*Grazie per l'attenzione*