



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE

Dipartimento di Medicina Animale, Produzione e Salute

Tesi di laurea in Biotecnologie per l'Alimentazione

**ACCREDITAMENTO DEL LABORATORIO SULLE PROVE
MICROBIOLOGICHE IN MATRICI ALIMENTARI CON IL SISTEMA
TEMPO®**

Relatore
Prof. Leonardo Alberghini
Correlatore
Prof. Valerio Giaccone
Dott.ssa Laura Ortolano

Laureanda:
Vanessa Carollo
Matricola n. 1035244

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

INDICE

0 RIASSUNTO	4
1 INTRODUZIONE.....	5
1.1 Pacchetto igiene: regolamenti sulla sicurezza alimentare	5
1.2 Metodi alternativi.....	8
1.3 Accredia	9
1.4 Visita ispettiva da parte di Accredia	10
1.5 I microrganismi	11
1.6 La tecnica TEMPO®	13
1.6.1 Funzionamento tecnica TEMPO®	14
1.7 La validazione	16
1.7.1 Validazione primaria.....	19
1.7.2 Validazione secondaria	20
2 MATERIALI E METODI	23
2.1 Campionamento	23
2.1.1 Modalità di campionamento	23
2.2 Campioni esaminati	24
2.3 Preparazione dei campioni	32
2.4 Procedure per la conta diretta degli indicatori di qualità nei prodotti alimentari mediante la tecnica TEMPO®	33
2.4.1 TEMPO® TEST	33
2.5 Taratura degli strumenti.....	36
2.5.1 Autoclave	37
2.5.2 Termostati	38
2.5.3 Bilancia tecnica	39
2.5.4 Taratura apparecchiature TEMPO®	41
2.6 Verifica dell'idoneità tecnica del personale	41
2.6.1 Criteri per l'accettabilità della ripetibilità e della proporzionalità dell'inoculo.....	41
2.4.2 Esecuzione prove per la valutazione della ripetibilità del conteggio	43
2.6 Validazione secondaria della tecnica TEMPO®	45
2.6.1 Test di Huber	52
2.6.2 Test di Shapiro-Wilk.....	52
2.6.3 Incertezza di misura.....	53
3 RISULTATI.....	55
4 DISCUSSIONE	64

4.1 Parametro precisione	64
4.2 Operatori	65
4.3 Parametro esattezza.....	67
4.4 La visita ispettiva	68
5 Conclusioni	74
5.1 Prospettive future	76
6 APPENDICE.....	77
6 BIBLIOGRAFIA	93
SITOGRAFIA	96
NORMATIVE.....	96

0 RIASSUNTO

Nel lavoro viene presentata una procedura necessaria ad accreditare il metodo TEMPO® per la determinazione di *Escherichia coli*, Stafilococchi coagulasi positivi, Microrganismi a 30°C, Coliformi totali ed Enterobatteri in matrici alimentari appartenenti alle categorie II e IV. L'accreditamento è un procedimento con cui un organismo riconosciuto attesta formalmente la competenza di un organismo o persona a svolgere funzioni specifiche. Per rendere possibile l'accreditamento abbiamo sottoposto il metodo alternativo a validazione secondaria, dato che la validazione primaria è stata precedentemente condotta dalla bioMérieux. La validazione prevede il calcolo di precisione ed esattezza, due componenti dell'accuratezza. L'esattezza, a sua volta, per essere calcolata necessita della verifica dell'idoneità tecnica dell'operatore coinvolto nelle diverse fasi di analisi. L'accreditamento è un percorso molto complesso, il cui risultato non dipende solo dalla validità dei calcoli effettuati ma anche dall'attenzione alla qualità interna del laboratorio e quindi a corsi di aggiornamento per il personale, alle tarature, al campionamento, all'accettazione dei campioni secondo le ISO di riferimento e all'emanazione corretta dei rapporti di prova. La qualità di una misura, e quindi il relativo risultato, si basa sulla validità del metodo utilizzato.

Il lavoro è stato condotto su un totale di 114 campioni contaminati naturalmente e 26 campioni contaminati artificialmente. Al termine del lavoro di validazione secondaria è stata affrontata la visita ispettiva grazie alla quale, per mezzo di controlli accurati sui risultati, abbiamo ottenuto l'accreditamento del laboratorio per l'utilizzo della tecnica TEMPO®. I controlli effettuati garantiscono che il laboratorio è in grado di fornire ai clienti risultati precisi, affidabili e corretti. L'importanza di questo nuovo metodo risiede nella velocità e precisione con cui si ottengono i risultati, si tratta infatti di un metodo automatizzato che fornisce, dopo un tempo di incubazione prefissato, una stima chiara e accurata della colonie.

1 INTRODUZIONE

La sicurezza alimentare è divenuta negli ultimi anni una questione di centrale importanza sia per il legislatore che per il consumatore. Con la produzione alimentare che aumenta di giorno in giorno, l'introduzione di nuove tecniche produttive e la globalizzazione che ha aumentato il flusso di prodotti alimentari tra i paesi, si rende sempre più necessario un controllo accurato e allo stesso tempo rapido. A partire dall'emanazione del Libro Verde sui principi generali della legislazione in materia alimentare (1997) e successivamente con la pubblicazione del Libro Bianco sulla sicurezza alimentare (2000) sono stati compiuti diversi progressi. Sono nate, in tal senso, diverse leggi e regolamenti che disciplinano la produzione alimentare ed il controllo applicato ad essa, tra cui, i più importanti, il REGOLAMENTO N. 178/2002 e il pacchetto igiene.

1.1 Pacchetto igiene: regolamenti sulla sicurezza alimentare

I recenti regolamenti comunitari costituenti il cosiddetto "pacchetto igiene" approfondiscono e precisano le tematiche della sicurezza alimentare e le modalità di applicazione del sistema HACCP. I regolamenti che costituiscono il pacchetto igiene sono i regolamenti (CE) 852, 853, 854, 882/2004, e Direttiva 2002/99:

Regolamento (CE) 852/2004

Tale Regolamento stabilisce in particolare quanto segue:

- requisiti generali e specifici in materia di igiene, validi anche per la produzione primaria
- analisi dei pericoli e dei punti critici e conferma del sistema HACCP come strumento di analisi e controllo delle condizioni di igiene e sicurezza delle produzioni alimentari;
- nel caso l'applicazione del regolamento abbia impatto significativo sulla salute pubblica, la Commissione consulta per un parere l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare.
- In particolare, si richiama l'attenzione all'obbligo della formazione degli operatori del settore.

Regolamento (CE) 853/2004

Il Regolamento stabilisce quanto segue:

- gli stabilimenti adibiti alle lavorazioni di prodotti animali devono essere riconosciuti dalle autorità nazionali competenti.
- i prodotti di origine animale devono essere contrassegnati, nei casi previsti, da un apposito bollo sanitario apposto ai sensi del Regolamento 854/2004;
- devono essere redatti elenchi di Paesi Terzi dai quali sono consentite le importazioni di prodotti animali. Il Regolamento stabilisce i requisiti di base per l'ammissione di un determinato paese terzo nel suddetto elenco; sono previste disposizioni specifiche per l'importazione di prodotti della pesca; i gestori dei macelli devono ottenere informazioni che consentano la rintracciabilità per le carni di tutte le specie da loro trattate, eccetto la selvaggina selvatica;
- vengono definite le condizioni di lavorazione, stoccaggio, trasporto dei diversi tipi di prodotti di origine animale, precisando anche le temperature a cui tali operazioni devono essere effettuate.

Regolamento (CE) 854/2004

il Regolamento 854/2004 stabilisce quanto segue:

- requisiti per il riconoscimento degli stabilimenti da parte delle Autorità competenti;
- obbligo per gli operatori del settore alimentare di fornire alle Autorità tutta l'assistenza richiesta nell'esecuzione del controllo;
- i controlli sono basati sui principi del sistema HACCP;
- compiti e responsabilità del veterinario ufficiale nel controllo delle carni fresche
- modalità e frequenza dei controlli da parte delle Autorità competenti riguardo ai seguenti alimenti di origine animale: molluschi e bivalvi vivi, prodotti della pesca, latte e prodotti da esso derivati;

Regolamento (CE) 882/2004

Obiettivi del Regolamento 882/2004 sono:

- prevenire o ridurre ad un livello accettabile i rischi derivati dall'ambiente per la salute umana e animale;
- garantire la trasparenza nel mercato degli alimenti e dei mangimi, e la tutela degli interessi dei consumatori.

Il Regolamento stabilisce in particolare quanto segue:

- obblighi per i Paesi comunitari e scopi dei controlli ufficiali in materia di mangimi e alimenti;
- criteri operativi per le Autorità competenti designate dai Paesi membri dell'Unione Europea per tali controlli;
- accessibilità delle informazioni di pubblico interesse;
- tutela delle informazioni soggette a segreto professionale;
- requisiti dei metodi di campionamento e di analisi;
- elaborazione di misure da attuare in caso i controlli rivelino rischi per la salute dell'uomo o degli animali;
- completamento delle disposizioni della Direttiva 97/78/CEE in materia di controlli sui prodotti animali provenienti da Paesi terzi, con riferimento ai mangimi ed ai prodotti di origine non animale importati da Paesi non facenti parte dell'Unione Europea;
- istituzione di Laboratori comunitari a cui i Laboratori nazionali possono fare riferimento nella loro attività;
- misure amministrative in materia di: elaborazione di Piani nazionali di controllo, formazione del personale addetto ai controlli, controlli da effettuarsi nei Paesi comunitari e nei Paesi extracomunitari, sanzioni a livello comunitario.

Direttiva 2002/99/CE

La Direttiva stabilisce quanto segue:

- I Paesi comunitari sono responsabili delle misure finalizzate all'eradicazione delle malattie animali e delle condizioni da osservare per i prodotti di origine animale;
- casi in cui le Autorità statali possono richiedere certificati veterinari e relative modalità d'applicazione;
- disposizioni per l'accertamento della conformità alle norme comunitarie dei prodotti di origine animale importati da Paesi terzi;
- preparazione di elenchi di Paesi non facenti parte dell'Unione Europea che possono esportare prodotti di origine animale verso la Comunità, e requisiti che i Paesi extracomunitari devono presentare per essere compresi in tali elenchi.

Grazie a queste leggi, che costituiscono il cosiddetto pacchetto igiene, si è arrivati a definire una serie di standard e di limiti a cui tutte le aziende alimentari devono essere conformi se vogliono commercializzare i propri prodotti (regolamento CE 852/2004). Il pacchetto igiene, attraverso il piano HACCP, obbliga le aziende ad effettuare dei controlli periodici sui propri

prodotti (regolamento CE 852/2004). L'azienda deve quindi richiedere le analisi a dei laboratori di prova in grado di effettuare i test necessari. Ecco allora che si sono sviluppate, a pari passo con la legislazione alimentare, una serie di norme a carattere sia cogente che volontario con lo scopo di garantire uniformità nel risultato. In tal modo il laboratorio che le adotta risulta essere garante della qualità del prodotto (ISO 17025:2005). In particolare il regolamento (CE) 882/2004 prevede che "i laboratori di controllo ufficiale per la sicurezza alimentare devono essere in possesso di prove accreditate". Ne consegue che l'accreditamento della prova analitica è un requisito essenziale per la validità della prova medesima ai fini del controllo ufficiale (Calà et al. 2013). La principale direttiva che stabilisce i requisiti per la competenza dei laboratori di prova e di taratura e permette il raggiungimento di standard qualitativi elevati è la norma ISO 17025:2005. L'ultima edizione è basata sulla norma ISO 9001:2000, della quale riprende l'impostazione generale ponendo maggiore enfasi sulla competenza del personale e sull'affidabilità del dato analitico. Con la ISO 17025:2005 si identificano normative e linee guida, sviluppate dall'Organizzazione internazionale per la normazione (ISO), che servono per definire i requisiti per la realizzazione di un sistema di gestione della qualità, al fine di migliorare l'efficacia e l'efficienza nella realizzazione del prodotto e nell'erogazione del servizio, e quindi ottenere ed incrementare la soddisfazione del cliente.

1.2 Metodi alternativi

Affianco alla necessità di avere metodi normati, in grado di garantire uniformità ed esattezza nel risultato, oggi si è resa necessaria l'introduzione di metodi alternativi capaci di rispondere alle esigenze di un mercato che richiede sempre più rapidità negli scambi e con quantitativi sempre maggiori di merci (Viti 2005a, Moca 2011, Kawasaki et al. 2003). Queste nuove tecniche possono portare beneficio sia all'azienda che richiede l'analisi, riducendo il tempo di attesa dei risultati, sia al laboratorio che le effettua riducendo i costi totali (Viti 2005a). Nell'ambito dei piani aziendali di monitoraggio sono previsti controlli microbiologici sulle linee di lavorazione con regolari verifiche sulle materie prime (Frustoli et al. 2005). I metodi di analisi tradizionale, riconosciuti dall'organismo di certificazione internazionale ISO, sono universalmente accettati per le caratteristiche di esattezza e precisione elevate (Frustoli et al. 2005). Il problema principale delle tecniche tradizionali risiede nel fatto che richiedono tempi lunghi per ottenere l'esito definitivo. In tal senso può essere ritenuta necessaria l'introduzione di un metodo alternativo che come nel nostro caso dovrebbe permettere di velocizzare le risposte; tale metodo però deve avere: 'sensibilità

almeno equivalente a quella dei metodi di coltura ufficiali, applicabilità a tutte le matrici alimentari, semplicità, rapidità, economicità ed affidabilità (Frustoli et al. 2005). Nel mio lavoro ho affrontato la problematica dell'introduzione di un metodo alternativo in un laboratorio di analisi. Il metodo introdotto dai laboratori Fratini è la tecnica TEMPO®. Nel corso del tirocinio ho portato a termine tutti i passaggi necessari a ottenerne l'accreditamento. Per fare questo ho proceduto alla validazione secondaria della sistema TEMPO® dimostrando le capacità tecniche del laboratorio nell'usare tale metodo e poterlo quindi adottare nelle normali analisi di routine. Lo scopo è quindi dimostrare che tale tecnica, in quanto metodo alternativo, è affidabile, rapida ed automatizzata. Essa infatti fornisce risultati uno o due giorni prima rispetto al metodo tradizionale in un largo range di prodotti alimentari (Delamare et al. 2013).

1.3 Accredia

Un laboratorio che decide di adottare un sistema per la gestione della qualità è sottoposto a controlli periodici atti a verificarne le competenze tecniche e valutare il sistema di qualità dello stesso. Questa procedura prende il nome di accreditamento (REGOLAMENTO (CE) N. 765/2008). In Italia l'ente preposto all'accreditamento dei laboratori di prova e taratura è Accredia.

Accredia è l'Ente unico nazionale di accreditamento, riconosciuto dallo Stato il 22 dicembre 2009, nato come Associazione senza scopo di lucro. Le caratteristiche che Accredia deve avere per garantire una verifica delle organizzazioni che richiedono l'accreditamento sono (Accredia 2013, Tramontin 2009):

- **Imparzialità:** la rappresentatività di tutte le parti interessate nel comitato di certificazione garantisce l'uniformità di trattamento per chiunque presenti domanda di certificazione e/o ispezione
- **Indipendenza:** assenza di conflitti d'interesse
- **competenza:** è necessario che il personale addetto all'attività di certificazione sia culturalmente, tecnicamente e professionalmente qualificato
- **correttezza** : vietata la prestazione di consulenze sia direttamente che attraverso società collegate
- **fiducia:** garanzia continua nel tempo della validità della certificazione di parte Terza a tutela del mercato

- **internazionalità:** riconoscimento reciproco degli accreditamenti come passo fondamentale per il mutuo riconoscimento dei certificati e/o attestati emessi.

L'Italia si è adeguata al Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio n. 765, del 9 luglio 2008, che dal 1° gennaio 2010 è applicato per l'accredimento e la vigilanza del mercato in tutti i Paesi UE (Accredia 2013). Accredia valuta la competenza tecnica e l'idoneità professionale degli operatori di valutazione della conformità (Laboratori e Organismi), accertandone la conformità a regole obbligatorie e norme volontarie, per assicurare il valore e la credibilità delle certificazioni (Tramontin 2009, Accredia 2013).

Le attività dell'Ente si articolano in quattro Dipartimenti:

- Certificazione e ispezione;
- Laboratori di prova;
- Laboratori di prova per la sicurezza degli alimenti;
- Laboratori di taratura.

L'accredimento è un servizio svolto nell'interesse pubblico così che i consumatori finali, ma anche la Pubblica Amministrazione quando ricorre a fornitori esterni, possano fidarsi, fino all'ultimo anello della catena produttiva e distributiva, della qualità e sicurezza dei beni e dei servizi che circolano su un mercato sempre più globalizzato (Tramontin 2009, Accredia 2013). L'accredimento garantisce che i rapporti di prova e di ispezione e le certificazioni (di sistema, prodotto e personale) che riportano il marchio Accredia siano rilasciate nel rispetto dei più stringenti requisiti internazionali in materia di valutazione della conformità, e dietro una costante e rigorosa azione di sorveglianza sul comportamento degli operatori responsabili (Laboratori e Organismi) (Accredia 2013).

1.4 Visita ispettiva da parte di Accredia

La validazione secondaria è un percorso molto importante che un laboratorio di prova deve intraprendere se vuole ottenere l'accredimento di tecniche alternative di nuova introduzione (Viti 2005a). Per ottenere l'accredimento del metodo alternativo è necessario superare una serie di visite ispettive al termine del lavoro di preparazione della documentazione. Per ottenere l'accredimento della tecnica TEMPO® abbiamo fatto riferimento al documento ACCREDIA RT-08: "Requisiti tecnici- pto 5.4 Metodi di prova e di taratura e validazione dei metodi" (Accredia 2013). Questo documento è molto importante

per un laboratorio che voglia accreditare un metodo alternativo, esso infatti dettaglia e approfondisce i vari punti della norma ISO 17025:2005. Oltre a tale documento, interno ad Accredia, qualsiasi laboratorio che intende adottare un metodo alternativo come ufficiale in sostituzione ai metodi ISO deve fare riferimento alla norma ISO 16140.

Gli accreditamenti più noti sono quelli rilasciati a (Viti 2005a, Accredia 2013):

- strutture sanitarie o di servizio sanitario (nosocomi, laboratori di analisi cliniche, ambulatori, centri terapeutici);
- strutture socio assistenziali (case famiglia, case di cura per lungo degenza, residenze sanitarie assistite – RSA);
- centri di formazione primaria, secondaria, superiore e professionale, sia pubblici che privati;
- laboratori di prova (analisi chimiche, fisiche e biologiche; prove meccaniche ed elettriche);
- organismi di certificazione di sistema, di prodotto e del personale.

Il regolamento CE 756/2008 stabilisce norme riguardanti l'organizzazione ed il funzionamento dell'accreditamento; fornisce inoltre un quadro di riferimento per la vigilanza del mercato dei prodotti, per garantire un'elevata protezione della salute e della sicurezza (Calà et al. 2013). Nel nostro caso, così come avviene generalmente, l'accreditamento si svolge con una visita ispettiva che corrisponde ad una verifica, da parte di 2 auditor, delle modalità di azione dell'operatore. In particolare sono controllate le procedure interne in relazione alle ISO di riferimento e quelle relative al metodo alternativo. L'obiettivo ultimo è verificare la correttezza dell'operato e quindi dare garanzia sui risultati forniti dal laboratorio in seguito all'analisi.

1.5 I microrganismi

La sicurezza e la qualità microbiologica di un alimento sono determinate dall'assenza di microrganismi potenzialmente pericolosi e delle loro tossine e da microrganismi alterativi. Il numero e il tipo di microrganismi presenti in un alimento possono essere utilizzati per valutare la sicurezza del prodotto (Parente 2008). Essendo impraticabile analizzare ogni microrganismo presente all'interno di un alimento si fa ricorso all'analisi solo di alcuni

microrganismi in grado di indicare una situazione potenzialmente pericolosa. Questi sono chiamati microrganismi marker (Parente 2008).

I microrganismi utilizzati come marker vengono suddivisi in due categorie (Parente 2008):

- organismi indicatori della qualità microbiologica, utili nel valutare l'idoneità delle condizioni di processo e di conservazione adottate; Tra questi sono analizzati i microrganismi aerobi totali e le enterobatteriacee;
- organismi indicatori della sicurezza microbiologica che suggeriscono la possibilità di un pericolo di tipo microbiologico. Tra questi sono analizzati i Coliformi totali, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

I microrganismi che possono essere rilevati mediante il metodo automatizza TEMPO® sono:

- ***Escherichia coli***

Escherichia coli è un microrganismo a forma bastoncellare; gram-negativo, aerobio o anaerobio facoltativo e non sporigeno. Questo microrganismo cresce alla temperatura di 44,5C°. Il suo terreno di coltura utilizzato per le analisi di routine mediante metodo ISO è il TBX (TRYPTONE BILE X-GLUC (TBX) AGAR). Il genere *Escherichia*, insieme ad altri generi (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Serratia* sono solo alcuni) viene raggruppato sotto il nome di coliformi. Al suo interno si distinguono almeno 171 sierotipi. È una delle specie principali di batteri che vivono nella parte inferiore dell'intestino di animali a sangue caldo (uccelli e mammiferi, incluso l'uomo), e che sono necessari per la digestione corretta del cibo, per questo *Escherichia coli* è ricercato non solo negli alimenti ma anche come contaminante delle acque. Nella tecnica ISO tradizionale le colonie sono facilmente riconoscibili dopo incubazione in quanto il terreno, di colore giallo, rende visibili le colonie che presentano una colorazione blu/verde (Lazzerini e Tinti 2012).

- **Enterobatteri**

Gli enterobatteri includono un numero ampio di batteri, il cui *habitat* naturale è costituito dall'intestino dell'uomo. Questi batteri sono accomunati da caratteristiche antigeniche e biochimiche tipiche dell'intero gruppo. Secondo il metodo ISO gli enterobatteri crescono su un terreno chiamato VRBGA (VIOLET RED BILE GLUCOSE AGAR) e ne viene stimolata la crescita grazie ad incubazione a 35/37°C; se vengono coltivati in presenza di ossigeno, ovvero in aerobiosi, gli enterobatteri sono produttori di citocromi e attraverso il ciclo di

Krebs ricavano energia ossidando l'acido piruvico. Alla prova dell'ossidasi risultano negativi, non possedendo il Citocromo c. Le colonie sono facilmente rilevabili perché sono di una colorazione porpora su terreno rosso chiaro (Lazzerini e Tinti 2012).

- **Stafilococchi coagulasi positivi**

Gli Stafilococchi sono batteri Gram positivi e catalasi positivi di forma sferica (0,5-1 μm di diametro) immobili in quanto sprovvisti di ciglia e/o flagelli. Sono microrganismi aerobi o anaerobi facoltativi, disposti in gruppi irregolari, ubiquitari, nel senso che non prediligono un solo tipo di habitat. Secondo il metodo ISO il loro terreno di coltura è il BP (Baird Parker agar). Tale terreno presenta una colorazione giallo scuro. Le colonie risultano molto visibili in quanto presentano una colorazione nera (Lazzerini e Tinti 2012).

- **Coliformi totali**

I coliformi sono un gruppo di batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* con le quali condividono alcune caratteristiche sia morfologiche sia biochimiche. Sono batteri a forma bastoncellare, Gram-negativi, asporigeni, aerobi ed anaerobi facoltativi. Secondo il metodo ISO vengono coltivati a 35-37 °C in terreno VRBA (VIOLET RED BILE AGAR). Sono organismi ubiquitari, alcuni sono presenti nel materiale fecale, e sono quindi utilizzati come indicatori di inquinamento sia delle acque sia degli alimenti. Le colonie di questi microrganismi sono di una colorazione porpora a partire da matrici alimentari in terreno VRBA (Lazzerini e Tinti 2012).

- **Microrganismi a 30°C**

Il termine carica si riferisce a tutti quei microrganismi che crescono nel terreno non selettivo PCA (PLATE COUNT AGAR) in seguito ad incubazione generica a 30C. In questo caso si contano tutte le colonie che sono visibili nella piastra in maniera indifferenziata; normalmente si tratta di colonie con forma ovale e di colorazione giallastra (Lazzerini e Tinti 2012).

1.6 La tecnica TEMPO®

L'obiettivo dell'analisi microbiologica è garantire la tutela della salute e la qualità della vita dei consumatori; questo è perseguibile in accordo alla norma ISO/IEC 17025:2005, la cui finalità principale è garantire l'attendibilità dei risultati ottenuti in seguito all'analisi microbiologica svolta in laboratorio. La norma ISO/IEC 17025:2005 è uno standard comprensivo di requisiti gestionali e tecnici, impiegato in tutto il mondo per conseguire l'accreditamento di prove e taratura da parte dei laboratori che se ne occupano. Oltre alle

normali procedure che fanno riferimento alla norme ISO all'interno del laboratorio Fratini abbiamo steso diverse procedure per l'analisi attraverso la tecnica TEMPO®. Le esigenze dell'industria alimentare di valutare in modo sempre più veloce la qualità microbiologica delle materie prime e dei prodotti finiti, nonché del processo produttivo, hanno spinto allo sviluppo di metodi microbiologici alternativi che siano più veloci e/o più facili da eseguire rispetto ai corrispondenti metodi di riferimento; alcuni di questi metodi alternativi possono essere automatizzati; ciò che è importante è che si conseguono risultati equivalenti a quelli prodotti dai metodi di riferimento (ISO 16140:2003) (Kawasaki et al. 2003).

1.6.1 Funzionamento tecnica TEMPO®

La tecnica TEMPO® si basa sul metodo di conteggio MPN (most probable number). Il centro del sistema TEMPO® è la TEMPO® card che è costituita da una serie di pozzetti, 3 file di 16, ognuno dei quali corrisponde ad una provetta da diluizione. Nella prima fila sono inoculati 225µl, nella seconda 22,5µl e nella terza 2,25µl; il caricamento di questi volumi permette una diluizione di dieci volte tra una riga e la successiva (Owen 2010). Oltre alla card l'altro elemento fondamentale è il terreno di coltura. Per ogni terreno sono aggiunti 3ml di acqua sterile e 1ml di campione. Il terzo fattore fondamentale è la temperatura e i tempi di incubazione, che sono specifici per ogni microrganismo. Al termine dell'incubazione la TEMPO® card è posta in un lettore automatico dove è rilevato il numero di patogeni grazie all'emissione di fluorescenza dovuta alla fermentazione del glucosio che causa acidificazione del reagente e quindi reazione di quenching (figura 1).

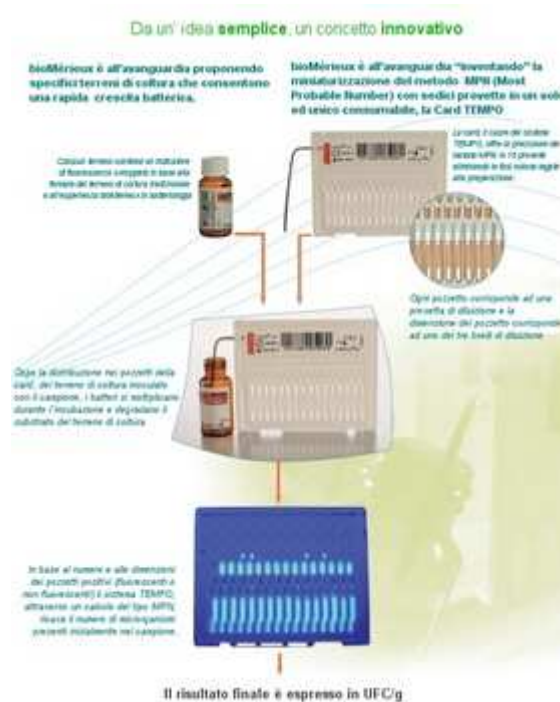


Figura1: Materiale di riferimento da utilizzare nell'esecuzione di un conteggio con la tecnica TEMPO®

Utilizzando la tecnica TEMPO® abbiamo potuto notare una serie di vantaggi derivanti dalla facilità e velocità di utilizzo di questa metodologia. Tra i pregi abbiamo valutato come principali la standardizzazione, la tracciabilità, la riduzione dei tempi e la riduzione dei costi.

Standardizzazione

In una normale analisi microbiologica i passaggi vengono eseguiti manualmente e questo aumenta la possibilità di errore. In questa nuova tecnica l'automatizzazione è una delle caratteristiche principali, dal momento che la maggior parte delle tappe analitiche sono effettuate dalla macchina. La tecnica TEMPO® aumenta la comparabilità dei risultati, sia nello stesso laboratorio, che tra laboratori diversi, eliminando altresì i fattori di variabilità legati all'operatore.

Tracciabilità

Alcuni problemi rilevati nelle classiche procedure ISO sono dovuti alla difficoltà di rendere la procedura rintracciabile; questo è causato dai diversi lotti da prendere in considerazione (lotto del terreno, lotto del preparato, lotti di eventuali supplementi e lotti di eventuali test di conferma). Nella tecnica TEMPO®, invece, la tracciabilità è assicurata dall'identificazione fornita dal codice a barre. Un codice a barre univoco della card assicura la completa

tracciabilità per tutta la durata dell'analisi, dall'identificazione del campione fino al risultato finale.

Riduzione dei Tempi

Nella metodologia ISO i tempi di incubazione variano in base al microrganismo di riferimento ma risultano essere piuttosto elevati rispetto alla tempistiche della TEMPO® la quale permette di ottenere risultati più veloci rispetto al metodo tradizionale (ovvero 24 - 48 ore) e permette altresì una qualifica ed un orientamento più rapido delle materie prime, azioni correttive più rapide in caso di non conformità, rilascio accelerato dei prodotti finiti e una migliore rotazione degli stock.

Tutte le tecniche, di nuova introduzione, utilizzate in un laboratorio accreditato devono essere validate; lo scopo è confermare con apporto di evidenze oggettive che i requisiti per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti (Viti 2005a). La fase che permette ciò è la così detta fase di validazione che è in grado di definire i requisiti generali ed il protocollo del metodo di nuova introduzione. Per garantire che la fase di validazione sia avvenuta correttamente è necessario il confronto con gli standard Accredia così da permettere l'accreditamento del metodo alternativo d'interesse.

1.7 La validazione

Nel nostro caso ci siamo occupati della validazione del metodo alternativo TEMPO®. La validazione è una procedura piuttosto complessa, suddivisa in validazione primaria e validazione secondaria. La validazione primaria solitamente è eseguita dalla casa produttrice, o dal laboratorio che ha messo a punto il metodo, secondo la norma ISO 16140:2003. I laboratori che invece intendono acquisire un metodo alternativo sviluppato altrove devono seguire la procedura per la validazione secondaria.(Ballati 2004, Lazzerini e Tinti 2012) La validazione secondaria serve a dimostrare di essere in grado di eseguire il metodo con delle performance che non siano inferiori a quelle dichiarate dal protocollo di validazione. (Ballati 2004) Per poter effettuare una validazione secondaria è necessario che la ditta produttrice del metodo fornisca un attestato di validazione (Figura 2).



Alternative methods for agribusiness
Analytical performances certified

**VALIDATION CERTIFICATE FOR ALTERNATIVE ANALYTICAL METHOD
ACCORDING TO STANDARD EN ISO 16140: 2003**

Certificate No.: BIO 12/28 – 04/10

Validation date : 04.01.2010

End of validity : 04.01.2014

The company

BIOMERIEUX
Chemin de l'Orme
69280 MARCY L'ETOILE

is hereby authorized to refer to this AFNOR Validation certificate for the following alternative qualitative analysis method:

TEMPO STA

Ref. 80 002

Protocol reference: 12595 F

SCOPE

All human food products and pet food

RESTRICTIONS FOR USE

None

REFERENCE METHOD

EN ISO 6888-2 (1999) and amendment A1 (2003) – Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). Part 2: technique using rabbit plasma fibrinogen agar

Deputy General Manager
Jacques BESLIN

AFNOR Certification

11, rue Francis de Pressensé – 93571 La Plaine Saint-Denis Cedex - France
Phone +33 (0)1 41 62 80 00 – Fax +33 (0)1 49 17 90 00
certification@afnor.com - www.afnor-validation.com

Figura 2. Esempio di attestato di validazione fornito dalla casa produttrice del metodo TEMPO® (bioMérieux.). La validazione secondaria in questo caso è stata commissionata ad un organismo di certificazione che ha svolto tutti i test necessari. Nello specifico la validazione è stata seguita dalla AFNOR Certification.

I metodi di prova e/o taratura adottabili da un laboratorio possono essere suddivisi in di due categorie (Viti 2005a, Ballati 2004):

- 1 **Metodi normalizzati:** cioè pubblicati in norme internazionali (ISO), europee (EN) o nazionali (UNI);
- 2 **Metodi di prova non normalizzati :** cioè emessi da organizzazioni tecniche nazionali o internazionali (ad es. Rapporti ISTISAN, Quaderni IRSA) e metodi sviluppato da laboratori/centri di riferimento nazionali o comunitari o da centri di referenza nazionali accreditati. Elemento discriminante è che la responsabilità dei dati forniti è riferita non all'organizzazione che lo ha emesso, ma ai singoli autori;
- 3 **Metodi di prova sviluppati dal laboratorio** derivanti cioè da modifiche, integrazioni o estensioni di metodi normalizzati, adattati agli scopi del laboratorio, oppure metodi interni sviluppati interamente dal laboratorio sulla base di conoscenze ed esigenze proprie o ricavate dalla letteratura scientifica.

Nel primo caso il metodo è validato e il laboratorio deve solamente dimostrare che le sue prestazioni sono equivalenti a quelle dichiarate. Il laboratorio deve quindi confermare che può eseguire i metodi normalizzati prima di metterli in opera per le prove e/o le tarature (ISO 17025:2005). Nel secondo e nel terzo caso è necessario seguire una procedura di validazione del metodo alternativo.

La validazione è la conferma attraverso esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista sono soddisfatti (ISO 17025:2005).

La validazione di un metodo alternativo è la dimostrazione che il risultato ottenuto con il metodo alternativo sia comparabile, con un adeguato grado di confidenza, al risultato ottenuto con un metodo di riferimento (ISO 16140:2003).

La decisione di valutare un metodo alternativo è attribuita a supposte proprietà del metodo di risolvere esigenze del laboratorio come ad esempio:

- tempo di analisi/o risposta;
- facilità di esecuzione/o automazione,
- proprietà analitiche (precisione, accuratezza, limiti di determinazione);
- miniaturizzazione;
- riduzione dei costi.

La validazione di un metodo microbiologico può essere classificata in due categorie:

- a) **Validazione primaria**
- b) **Validazione secondaria**

1.7.1 Validazione primaria

La validazione primaria è un processo sperimentale di tipo esplorativo il cui scopo è stabilire i limiti operativi e le prestazioni di un metodo nuovo, un metodo normalizzato non adeguatamente caratterizzato, un metodo normalizzato modificato dal laboratorio, un metodo sviluppato dal laboratorio (metodo interno)(Viti 2005a, Ballati 2004, Lazzerini e Tinti 2012, ISO16140:2003).

Come precisato nella norma ISO 16140:2003, la validazione primaria può essere suddivisa in due fasi:

- 1) Studio comparativo del metodo alternativo verso il metodo di riferimento;
- 2) studio inter-laboratorio dei due metodi.

I metodi di analisi possono essere di tipo qualitativo, cioè identificano la presenza/assenza del microrganismo nella matrice analizzata, e quantitativi, identificano cioè una specie o un gruppo di batteri presenti in una matrice e ne determinano il numero delle cellule vitali per unità di peso o volume. Il risultato è espresso come **UFC/gr-ml**

Per la validazione dei metodi alternativi qualitativi, la fase 1 prevede il calcolo dell'*accuratezza relativa*, della *sensibilità relativa* e della *specificità relativa*. Questi parametri devono essere valutati su un numero adeguato di campioni naturalmente positivi (almeno 60) e per ogni categoria alimentare sulla quale si vuole validare il metodo; è poi necessario determinare il *limite di detection relativa* per almeno 5 ceppi target e *l'inclusività ed esclusività*, cioè la capacità di discriminare il microrganismo target da alti microrganismi presenti nella matrice. Lo scopo della fase 2, invece, è quello di determinare la variabilità dei risultati ottenuti in diversi laboratori utilizzando gli stessi campioni e comparando i dati con quelli ottenuti in fase 1 (Viti 2005a, Ballati 2004, Lazzerini e Tinti 2012).

Per quanto riguarda metodi quantitativi la fase 1 prevede:

- *il calcolo della linearità, dell'accuratezza e del bias*: si utilizzano 5 livelli di contaminazione per ogni tipologia di matrice (la contaminazione deve coprire l'intero range di interesse e deve comprendere un minimo, un massimo, un valore centrale e 2

intermedi). Preferenzialmente campioni naturalmente contaminati. I campioni possono essere analizzati in duplicato (idealmente in 5-10 repliche)

- *Calcolo del limite di quantificazione*
- *Calcolo della sensibilità, della specificità, dell'inclusività e dell'esclusività* (30 ceppi positivi, 20 ceppi negativi analizzati in doppio)

Lo scopo dello studio interlaboratorio, fase 2, è quello di determinare le performance del metodo alternativo (precisione ed accuratezza) rispetto al metodo di riferimento. Valutare la ripetibilità e la riproducibilità:

- 8 Laboratori competenti
- 1 matrice con 3 livelli di contaminazione (bassa , intermedia e alta contaminazione in modo da coprire l'intero range)
- Ogni campione analizzato in duplicato con il metodo di riferimento e quello alternativo

Nella fase di validazione della tecnica TEMPO®, i dati relativi alla validazione primaria ci sono stati forniti dalla casa madre bioMérieux.; il nostro obiettivo, ai fini dell'accreditamento, è la validazione secondaria del metodo.

1.7.2 Validazione secondaria

La validazione secondaria ha luogo quando un laboratorio procede ad implementare un metodo sviluppato e validato altrove. In tal senso "il documento di validazione", sviluppato nel proprio laboratorio, permette di dimostrare la validità del metodo utilizzato. Nel caso delle metodiche indicate dal Reg. CE 2073/2005 la verifica consiste in una validazione secondaria necessaria a verificare la capacità del laboratorio di rispettare le specifiche stabilite dalla validazione primaria (Guzzo et al. 2010). La validazione secondaria seleziona ed utilizza, semplificandole, le procedure della validazione primaria, valutandone però le prestazioni a lungo termine (es. predisponendo apposite carte di controllo). Poiché attualmente le specifiche non sono disponibili per tutti i metodi, i risultati del controllo di qualità esterno possono essere utilizzati come prima tappa per procedere alla validazione secondaria. (Viti 2005a, Ballati 2004, Lazzerini e Tinti 2012).

Per effettuare una validazione secondaria il laboratorio deve essere in possesso della documentazione riguardante gli studi di validazione primaria e cioè l'attestato di validazione. (figura 2)

Nel nostro caso abbiamo portato a termine una validazione secondaria. L'obiettivo di tale validazione è quello di garantire il raggiungimento dell'accuratezza che corrisponde al grado d'accordo tra il risultato di un procedimento analitico ed il valore di riferimento accettato. Il parametro accuratezza ha 2 componenti: precisione ed esattezza. La precisione è il grado di accordo tra risultati indipendenti ottenuti con procedimento d'analisi ben specificato. (Viti 2005a, Ballati 2004) L'esattezza è invece definita come il grado di accordo tra il valore medio ottenuto da una larga serie di risultati ed il valore di riferimento accettato (Viti 2005a, Ballati 2004). Se ad esempio noi consideriamo una serie di valori, come riportato in figura3, possiamo notare come questi risultino esatti, in quanto concentrati in un range ristretto, ma non precisi dato che si discostano dall'obiettivo centrale.

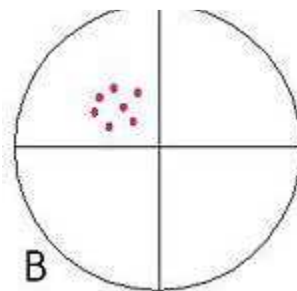


Figura3: Rappresentazione grafica di un metodo esatto ma impreciso

Oppure potremmo ottenere dei valori che risultano precisi, in quanto localizzati nella regione centrale, l'obiettivo, ma non esatti in quanto dispersivi rispetto al valore di riferimento (Figura4).

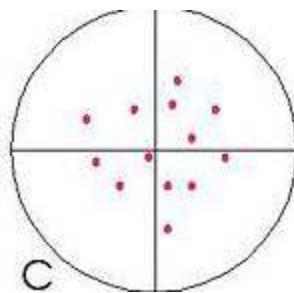


Figura4: rappresentazione grafica di un metodo preciso ma con scarsa esattezza.

Altro caso che si potrebbe verificare nel è quello in cui i dati non presentano ne precisione ne esattezza come riportato in figura5.

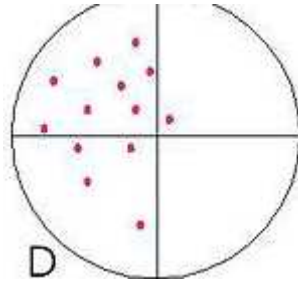


Figura5: rappresentazione grafica di un metodo impreciso e inesatto

Infine, ultimo caso, quello che dobbiamo perseguire ai fini della validazione del metodo e quindi l'accreditamento della procedure, è il raggiungimento di esattezza e precisione del metodo così da poterlo definire accurato. L'accuratezza è rappresentata in figura 6.

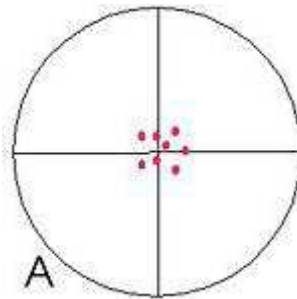


Figura6: rappresentazione di un metodo preciso ed esatto, quindi accurato.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Campionamento

Una fase molto importante nell'analisi microbiologica è il campionamento (ISO 7218:2007). Nei laboratori Fratini le procedure per il campionamento sono riportate nel documento IOV-7, il quale definisce le modalità operative da applicare per effettuare il campionamento di alimenti ed il trasporto dei relativi campioni.

2.1.1 Modalità di campionamento

I campioni devono essere totalmente rappresentativi dei lotti dai quali sono stati prelevati (ISO 17025:2005). A tal fine, ciascuna fornitura deve essere praticamente o teoricamente divisa in lotti di massa non maggiore alle 500 t ed una serie di campioni singoli deve essere prelevata da ciascun lotto e accuratamente mescolata per ottenere un campione sfuso dal quale, mediante successiva divisione, si ottengono i campioni di laboratorio (Laboratori Fratini 2010a). Il campionamento deve essere effettuato in modo tale da proteggere i campioni, gli strumenti di campionamento e il recipiente in cui sono posti i campioni da contaminazioni accidentali (pioggia, polvere). L'apparecchiatura utilizzata deve essere pulita, asciutta e priva di odori estranei. Tutte le operazioni di campionamento devono essere eseguite in un tempo sufficientemente breve al fine di evitare qualsiasi alterazione nella composizione dei campioni.)(ISO 7218:2007, ISO 17025:2005). Il numero delle unità di campionamento non deve essere inferiore a 5. Per la determinazione della salmonella nel latte in polvere per la prima infanzia, nei prodotti d'uovo e nei preparati per gelati il numero di campioni non deve essere inferiore a 10. Per i prodotti sfusi come ad esempio granaglie e farine ciascuna unità campionaria sarà costituita da almeno 50 gr di prodotto raccolto in contenitori sterili (ad es. sacchetti da Stomacher). La scelta sarà casuale per i prodotti solidi, mentre per quelli liquidi (latte) il prelievo del campione viene effettuato sul volume totale, reso omogeneo dopo una accurata agitazione. Qualora il lotto sia confezionato in contenitori che racchiudono due o più unità campionarie, la procedura di campionamento deve prevedere l'estrazione casuale del contenitore e, all'interno di questo, l'estrazione casuale dell'unità campionaria La quantità minima da campionare è di 100 g. (Laboratori Fratini 2010a)In fine è necessario ricordare che il trasporto deve essere effettuato mantenendo il campione al riparo dalla luce ed assicurando che non subisca alterazioni. La consegna al laboratorio deve avvenire nell'arco delle 24 ore dal campionamento. Le temperature e le matrici a cui prestare maggiore attenzione sono(Laboratori Fratini 2010a, ISO 7218:2007, ISO 17025:2005):

- Prodotti stabili: temperatura ambiente
- Prodotti freschi e refrigerati: tra 0 e + 4°C
- Prodotti surgelati e congelati: sotto i - 18°C
- Prodotti pastorizzati e simili : tra 0 e + 4°C
- Prodotti stabili alterati: tra 0 e + 4°C
- I cibi facilmente deteriorabili devono essere stoccati ad una temperatura tra 0°C e +2°C.

E' opportuno ricordare che il campionamento segue la stessa procedura sia nel caso si faccia riferimento al metodo ISO che nel caso di campionamenti che prevedono la successiva analisi con metodo alternativo(ISO 16140:2003).

2.2 Campioni esaminati

Per la validazione della tecnica TEMPO® abbiamo utilizzato campioni naturalmente contaminati provenienti dall'attività di routine del laboratorio; in particolare abbiamo scelto le tipologie di matrice per le quali sarà previsto l'uso della tecnica TEMPO® nell'esecuzione delle analisi. Sono stati preferiti campioni naturalmente contaminati in quanto più rappresentativi della situazione reale a cui sarà sottoposta la nuova tecnica, ma soprattutto perché in questo modo la metodologia per la validazione secondaria richiede solo di allocare la procedura all'interno dei limiti operativi definiti dalla validazione primaria (ISO 16140:2003).

Per semplificare il procedimento di analisi e validazione gli alimenti sono stati suddivisi in categorie. Il riferimento per la classificazione delle matrici alimentari adottato dal laboratorio è la norma ISO 19036:2006 (par. A.2.2), secondo quanto di seguito riportato:

- Categoria I: alimenti liquidi e in polvere (latte, latte di cocco, latte in polvere);
- Categoria II: alimenti solidi ben miscelati (carne tritata, carne meccanicamente separata, carne di salsiccia, panna montata, gelato al latte, crema di soia, carote a fili);
- Categoria III: alimenti solidi a pezzatura piccola o molto piccola (prezzemolo /funghi disidratati, carote/sedano grattugiato, insalata, gamberetti, cereali, nocciole);
- Categoria IV: altri solidi (carne non tritata, formaggi, pasticcini, gastronomia).

Le categorie utilizzate ai fini della validazione secondaria della tecnica TEMPO® sono la categoria II e la categoria IV.

Per alcuni microrganismi, in alcune matrici, si è reso necessario effettuare una contaminazione artificiale in quanto normalmente assenti, o in numero insufficiente per essere contati. Questo è stato necessario soprattutto per i microrganismi patogeni indicatori di sicurezza alimentare come *Escherichia coli* e gli Stafilococchi coagulasi positivi. Sono state utilizzate matrici contaminate artificialmente, affiancate alle matrici naturalmente contaminate, per poter effettuare il calcolo del parametro esattezza associato alla tecnica TEMPO®. Abbiamo dovuto procedere a una contaminazione artificiale per poter ottenere un numero di misurazioni sufficienti ad effettuare il calcolo dell'esattezza della tecnica TEMPO® che altrimenti, con i soli campioni naturalmente contaminati, non saremmo stati in grado di ottenere. In tabella 1a sono riportate tutte le matrici alimentari, naturalmente contaminate, analizzate nel corso delle diverse fasi della validazione secondaria e i relativi codici identificativi. In tabella 1b sono invece riportati tutti i campioni contaminati artificialmente. In tabella 2 sono riportati i ceppi utilizzati per la preparazione dei campioni contaminati artificialmente e i relativi codici identificativi.

Tabella 1a: elenco dei campioni utilizzati per eseguire la validazione secondaria del metodo TEMPO®. Nella tabella, per ogni campione, è specificata la tipologia di alimento, la categoria alimentare di appartenenza secondo la norma ISO/TS 19036:2006 e i relativi codici identificativi utilizzati dal laboratorio. I campioni sono stati analizzati durante il periodo di tirocini, da gennaio ad aprile 2013. Si tratta di campioni provenienti dall'attività di routine del laboratorio.

Nome campione	Data analisi	Tipologia di campione	Categoria alimentare	Codice identificativo
N1	15/04/2013	Carote a fili	IV	3355
N2	15/04/2013	Carote a fili	IV	3356
N3	15/04/2013	Carne tritata	II	3361
N4	22/02/2013	Carne di salsiccia	II	2086
N5	25/02/2013	Formaggio Asiago	IV	2200
N6	26/02/2013	Carne tritata	II	2254
N7	27/02/2013	Carote a fili	II	2293
N8	28/02/2013	Carne tritata	II	2300
N9	01/03/2013	Formaggio	IV	2315
N10	05/03/2013	Formaggio	IV	2363
N11	08/03/2013	Carne tritata	II	2391
N12	14/03/2013	Carne tritata	II	2503
N13	20/03/2013	Carne tritata	II	2610
N14	21/03/2013	Carne salsiccia	II	2704
N15	22/03/2013	Carote a fili	II	2745
N16	25/03/2013	Lasagne al forno	IV	2777
N17	26/03/2013	Polpette di carne	II	2799
N18	27/03/2013	Carne di salsiccia	II	2811
N19	2/04/2013	Formaggio	IV	2872
N20	3/04/2013	Baccalà	IV	2930
N21	4/04/2013	Carote a fili	II	3004
N22	5/04/2013	4 gamma	II	3042
N23	8/04/2013	Carne tritata	II	3071
N24	25/02/2013	Gastronomia	IV	2211
N25	28/02/2013	Carne tritata	II	2333
N26	28/02/2013	Formaggi	IV	2336
N27	05/03/2013	Gelato	II	2364
N28	08/03/2013	Salsiccia	II	2399
N29	14/03/2013	Salsiccia	II	2504
N30	20/03/2013	4 gamma	II	2615
N31	01/04/2013	Carne tritata	II	2780
N32	04/04/2013	Gastronomia	IV	2801
N33	09/04/2013	Carne tritata	II	2812
N34	10/04/2013	Carne tritata	II	2830
N35	10/04/2013	Carne tritata	II	2831
N36	10/04/2013	Carne tritata	II	2832
N37	10/04/2013	Carne tritata	II	2833
N38	10/04/2013	Carne tritata	II	2834
N39	10/04/2013	Carne tritata	II	2840
N40	10/04/2013	Carne tritata	II	2841
N41	10/04/2013	Carne tritata	II	2842
N42	10/04/2013	Carne tritata	II	2843
N43	10/04/2013	Carne tritata	II	2844

Nome campione	Data analisi	Tipologia di campione	Categoria alimentare	Codice identificativo
N44	17/04/2013	Gastronomia	IV	2994
N45	17/04/2013	Gastronomia	IV	2995
N46	17/04/2013	Gastronomia	IV	2996
N47	17/04/2013	Gastronomia	IV	2997
N48	17/04/2013	Gastronomia	IV	2998
N49	17/04/2013	Gastronomia	IV	2999
N50	17/04/2013	Gastronomia	IV	3000
N51	17/04/2013	Gastronomia	IV	3001
N52	17/04/2013	Gastronomia	IV	3002
N53	17/04/2013	Gastronomia	IV	3007
N54	17/04/2013	Gastronomia	IV	3008
N55	17/04/2013	Gastronomia	IV	3011
N56	17/04/2013	Gastronomia	IV	3012
N57	17/04/2013	Gastronomia	IV	3013
N58	17/04/2013	Gastronomia	IV	3014
N59	17/04/2013	Gastronomia	IV	3015
N60	17/04/2013	Gastronomia	IV	3016
N61	17/04/2013	Gastronomia	IV	3017
N62	17/04/2013	Gastronomia	IV	3018
N63	17/04/2013	Gastronomia	IV	3019
N64	17/04/2013	Formaggi	IV	3040
N65	17/04/2013	Formaggi	IV	3042
N66	17/04/2013	Formaggi	IV	3043
N67	17/04/2013	Formaggi	IV	3044
N68	17/04/2013	Formaggi	IV	3045
N69	17/04/2013	Formaggi	IV	3046
N70	17/04/2013	Formaggi	IV	3047
N71	17/04/2013	Formaggi	IV	3048
N72	17/04/2013	Formaggi	IV	3049
N73	17/04/2013	Formaggi	IV	3050
N74	17/04/2013	Formaggi	IV	3052
N75	17/04/2013	Formaggi	IV	3053
N76	17/04/2013	Formaggi	IV	3054
N77	17/04/2013	Formaggi	IV	3055
N78	17/04/2013	Formaggi	IV	3056
N79	17/04/2013	Formaggi	IV	3057
N80	18/04/2013	4 Gamma	II	3073
N81	18/04/2013	4 Gamma	II	3074
N82	18/04/2013	4 Gamma	II	3075
N83	18/04/2013	4 Gamma	II	3076
N84	18/04/2013	4 Gamma	II	3077
N85	18/04/2013	4 Gamma	II	3078
N86	18/04/2013	4 Gamma	II	3079
N87	18/04/2013	4 Gamma	II	3080
N88	18/04/2013	4 Gamma	II	3081
N89	18/04/2013	4 Gamma	II	3082

Nome campione	Data analisi	Tipologia di campione	Categoria alimentare	Codice identificativo
N90	18/04/2013	4 Gamma	II	3083
N91	18/04/2013	4 Gamma	II	3084
N92	18/04/2013	4 Gamma	II	3085
N93	18/04/2013	4 Gamma	II	3086
N94	18/04/2013	4 Gamma	II	3087
N95	18/04/2013	4 Gamma	II	3088
N96	18/04/2013	4 Gamma	II	3089
N97	18/04/2013	4 Gamma	II	3090
N98	18/04/2013	4 Gamma	II	3091
N99	18/04/2013	4 Gamma	II	3092
N100	18/04/2013	4 Gamma	II	3093
N101	18/04/2013	4 Gamma	II	3094
N102	18/04/2013	4 Gamma	II	3095
N103	18/04/2013	4 Gamma	II	3096
N104	18/04/2013	4 Gamma	II	3097
N105	18/04/2013	Carne tritata varia	II	3112
N106	18/04/2013	Carne tritata varia	II	3113
N107	18/04/2013	Carne tritata varia	II	3114
N108	18/04/2013	Carne tritata varia	II	3116
N109	18/04/2013	Carne tritata varia	II	3118
N110	18/04/2013	Carne tritata varia	II	3119
N111	18/04/2013	Carne tritata varia	II	3120
N112	18/04/2013	Carne tritata varia	II	3121
N113	18/04/2013	Carne tritata varia	II	3122
N114	18/04/2013	Carne tritata varia	II	3123

Tabella 1b: nella tabella seguente sono riportati tutti i campioni contaminati artificialmente. Per ogni campione è riportata la data di analisi, la matrice alimentare utilizzata per la contaminazione, la categoria alimentare di appartenenza secondo la norma ISO/TS 19036:2006, il ceppo batterico utilizzato e il grado di contaminazione.

Nome campione	Data	Matrice contaminata	Categoria	Ceppo utilizzato	Grado contaminazione UFC/ml
A1	16/04/2013	Formaggio asiago	IV	<i>Staphylococcus aureus</i> 0485E7	1000-9999
A2	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Staphylococcus aureus</i> 0485E7	1000-9999
A3	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Staphylococcus aureus</i> 0485E7	1000-9999
A4	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Staphylococcus aureus</i> 0485E7	1000-9999
A5	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E7	10000-99999
A6	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E4	100-999
A7	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E7	1000-9999
A8	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E4	100-999
A9	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E7	1000-9999
A10	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E4	100-999
A11	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E4	100-999
A12	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E7	1000-9999
A13	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E7	1000-9999
A14	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E7	10000-99999
A15	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E7	1000-9999
A16	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E4	100-999
A17	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E4	100-999
A18	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E4	100-999
A19	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E7	1000-9999
A20	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E7	1000-9999
A21	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E7	1000-9999
A22	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E7	1000-9999
A23	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0791E7	1000-9999
A24	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0483E3	10-99
A25	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0483E3	10-99
A26	19/04/2013	Carne tritata	II	<i>Escherichia coli</i> 0483E3	10-99

Tabella 2: nella tabella seguente sono riportati i ceppi batterici utilizzati per la preparazione dei campioni contaminati artificialmente. Per ogni ceppo è riportato il codice identificativo secondo la nomenclatura ATCC (American Type Culture Collection) e il codice della ditta Microgenomics®.

Ceppo batterico certificato	Codice ATCC	Codice Microgenomics®
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 8739	0483E3
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 8739	0483E7
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 51813	0791E4
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	ATCC® 6538	0485E7

Le contaminazioni artificiali sono state eseguite contaminando con una sospensione a titolo noto del ceppo microbico di riferimento matrici alimentari di cui era stata precedentemente valutata l'assenza dell'organismo target, mediante misura con il metodo ISO di riferimento. Per effettuare la contaminazione artificiale abbiamo utilizzato i kit Epower™ della Microbiologics®. La contaminazione è stata condotta seguendo le istruzioni riportate dal produttore dei ceppi. I livelli di concentrazione scelti sono quelli che più si avvicinano alle condizioni di operatività del laboratorio (<100.000 ufc/g)

Per la verifica dei metodi per la conta di Stafilococchi coagulasi .positivi ed Escherichia coli abbiamo utilizzato come materiali di riferimento le corrispondenti colture ATCC.

Per i metodi Colonie a 30°C ed Enterobatteri abbiamo utilizzato come ceppo di riferimento colture ATCC di Escherichia coli che presentano capacità di crescita su i terreni che tali metodi raccomandano.

La contaminazione artificiale ha previsto tre fasi (ISO 16140:20039):

- 1) Analisi della matrice da contaminare per verificare l'effettiva assenza del germe target. L'analisi è stata condotta mediante il metodo ISO di riferimento per il microrganismo bersaglio.
- 2) preparazione e quantificazione del germe certificato fornito dalla ditta Microbiologics®;
- 3) preparazione delle concentrazioni utili alla contaminazione e successiva contaminazione delle matrici prescelte.

La prima fase ha consistito nel selezionare tra i diversi campioni analizzati dal laboratorio, nei giorni antecedenti la validazione secondaria, quelli in cui il germe target era assente o non quantificabile. Questo passaggio è stato fatto solo per quei microrganismi e su quelle matrici in cui, percorrendo lo storico delle analisi, non è stato possibile riscontrare un numero sufficiente di campioni contaminati utili alla validazione. Le matrici utili alla contaminazione sono state poste in congelatore al fine di mantenere inalterate le condizioni del campione fino al momento della conta (ISO 16140:2003).

Per eseguire la seconda fase ci siamo attenuti al protocollo fornitoci dalla ditta assieme al microrganismo. Per la contaminazione artificiale sono stati usati i kit certificati Epower™ della Microbiologics®.

La procedura operativa per la reidratazione e l'attivazione del kit è riportata di seguito:

1. Estrarre il flaconcino di pastiglie dal refrigeratore in cui è conservato e farlo equilibrare a temperatura ambiente.
2. Prima dell'uso, riscaldare il fluido idratante e quello di diluizione a 34 °C – 38 °C. Per l'idratazione del preparato liofilizzato si raccomanda un tampone fosfato sterile a pH 7,2.
3. Aggiungere fluido idratante in modo da ottenere la concentrazione batterica voluta, come riportato in tabella 3

4. Con pinzette sterili, trasferire la pastiglia (o le pastiglie) di microrganismi Epower™ nel fluido idratante. Non rimuovere l'essiccante dal flaconcino. Ritappare immediatamente e riportare a 2 °C – 8 °C.
5. Collocare la sospensione di microrganismi nell'incubatore a 34 °C – 38 °C per 30 minuti, per garantire la completa idratazione.
6. Subito dopo l'incubazione, miscelare il materiale idratato fino a ottenere una sospensione omogenea.

Esistono diversi kit con concentrazioni diverse di microrganismo. In Tabella 3 sono riportate le concentrazioni di microrganismi in base al kit e alla quantità di fluido di idratazione utilizzato, come specificato nel manuale del kit Epower™ della Microbiologics® .

Tabella 3: Esempi di concentrazione (UFC/ml) del volume di fluido idratante specificato

Codice pastiglia	1 ml	10 ml	100 ml
E2	100–999	10–99	1–9
E3	1000–9999	100–999	10–99
E4	10,000–99,999	1000–9999	100–999
E6	1,000,000–9,999,999	100,000–999,999	10,000–99,999
E7	10,000,000–99,999,999	1,000,000–9,999,999	100,000–999,999

Ai fini della nostra analisi abbiamo utilizzato i kit Epower™ E3, E4 ed E7.

L'ultima fase è stata la contaminazione delle matrici alimentari. Sono state effettuate 4 pesate di 10g dei diversi campioni selezionati in fase 1, a cui sono stati aggiunti 90ml di acqua peptonata.

La coltura di partenza, ottenuta nella fase 2, è stata aggiunta ai campioni seguendo lo schema riportato in tabella 4.

Il campione così preparato è stato sottoposto ad omogeneizzazione mediante omogeneizzatore automatico Stomacher modello 400 (AES Laboratoire, Combourg, France). Dovendo eseguire il test di validazione sulla tecnica TEMPO® sono state utilizzate le buste TEMPO® bags; in tal modo abbiamo mantenuto inalterato il processo di analisi condotto mediante tale tecnica, evitando di aggiungere fonti di variabilità (come consigliato dalla BioMérieux Spa). L'omogenato è stato lasciato riposare per 10 minuti per rivitalizzare eventuali batteri presenti. Questo passaggio è stato fatto al fine di ricreare il più possibile la condizione naturale (ISO 16140:2003).

Dopo aver lasciato riposare 10 minuti il preparato si è proceduto all'analisi mediante tecnica TEMPO® e ISO di riferimento.

I campioni contaminati, il microrganismo utilizzato per la contaminazione e il grado di contaminazione sono riportati in tabella 1b.

Tabella 4. allestimento colture batteriche per la contaminazione artificiale.

Coltura di partenza	Volume di fluido idratante	Concentrazione di partenza	Volume di inoculo	Concentrazione su campione
E3	10ml	100-999 UFC/ml	10ml	10-99 UFC/ml
E4	10ml	1000-9999 UFC/ml	10ml	100-999 UFC/ml
E7	100ml	100000-999999 UFC/ml	1ml	1000-9999 UFC/ml
E7	10ml	1000000-9999999 UFC/ml	1	10000-99999 UFC/ml

2.3 Preparazione dei campioni

Per la raccolta dei campioni e la preparazione della diluizione madre abbiamo seguito le indicazioni riportate nelle ISO vigenti (ISO 8261:2001, ISO 6887-4:2012). In particolare si è proceduto a un'iniziale diluizione 1:10 (diluizione madre) aggiungendo a 10g (o 10ml) di campione un volume pari a 90ml di Triptone sale, acqua peptonata, diluente tamponato con fosfato (Butterfield) in base al tipo di microrganismo e di matrice. I campioni così preparati sono stati sottoposti a omogeneizzazione mediante omogeneizzatore automatico Stomacher modello 400 (AES Laboratoire, Combourg, France) per 60s. L'omogenato è stato preparato utilizzando la busta TEMPO®. Le Buste TEMPO® sono dei sacchetti per omogeneizzatore automatico studiati appositamente per l'utilizzo con le apparecchiature TEMPO®. Sono delle buste in plastica, sterili, divise al loro interno in due sezioni per mezzo di un filtro a porosità specifica. In una sezione si inserisce il campione da analizzare e l'opportuno diluente, nell'altra si preleva l'omogenato filtrato una volta terminata l'omogeneizzazione. Con le buste TEMPO® si ottiene un preparato con meno particelle in sospensione e quindi minor torbidità che permette di ridurre il rumore di fondo in fase di lettura. Le buste TEMPO®, inoltre, consentono di limitare al minimo possibili ostruzioni del tubo di caricamento delle TEMPO® Card ed evitare errori di quantificazione dovuti a volumi errati di riempimento dei pozzetti (Torlak 2008). La TEMPO® Card è costituita da 3 serie di 16 pozzetti (piccoli, medi e grandi) con una differenza di volume di un log tra ogni serie di pozzetti. La card è stata progettata in modo da simulare il metodo del Numero Più Probabile (MPN). Una volta riempita la TEMPO® Card viene sigillata ermeticamente, per evitare qualsiasi rischio di contaminazione durante la successiva manipolazione (Torlak 2008).

L'intervallo di tempo massimo tra l'omogeneizzazione della diluizione madre e il trasferimento nelle TEMPO® card è di 45 minuti, come specificato dal produttore.

2.4 Procedure per la conta diretta degli indicatori di qualità nei prodotti alimentari mediante la tecnica TEMPO®

La tecnica TEMPO® permette di effettuare la conta diretta di diversi microrganismi indicatori di qualità nei prodotti alimentari, in particolare si possono analizzare:

- Conta delle enterobatteriacee in 22-27ore mediante metodo TEMPO® EB
- Conta della flora aerobica mesofila totale in 40-48 ore mediante metodo TEMPO® TVC
- Conta dei coliformi totali in 24-27 ore mediante metodo TEMPO® TC
- Conta di Escherichia coli in 22-27 ore mediante metodo TEMPO® EC
- Conta degli stafilococchi coagulasi positivi in 24-27 ore nei prodotti alimentari con il metodo TEMPO® STA

2.4.1 TEMPO® TEST

Per tutti i metodi TEMPO® sopraindicati la procedura di preparazione del campione e dall'apparecchiatura sono identici. Le differenze tra i vari metodi sono legate alla diluizione, dovuta al tipo di microrganismo analizzato e al possibile grado di contaminazione atteso, e alle temperature e tempi di incubazione.

Per eseguire il conteggio dei microrganismi presenti nei campioni alimentari analizzati si è seguita la procedura riportata nelle schede tecnica dei diversi metodi TEMPO® (vedi appendice) Per ottenere una diluizione 1:40 (la diluizione può essere modificata in funzione della contaminazione attesa), che permette di effettuare una conta compresa tra 10 e $4,9 \times 10^4$ UFC/g si è proceduto ad aggiungere 3 ml di acqua sterile nei flaconi contenenti il terreno disidratato. Si è usato un flacone per ogni campione utilizzato. Al terreno ricostituito è stato aggiunto 1ml di campione omogeneizzato prelevato dal compartimento filtrato della busta TEMPO®. Per la carica microbica totale la diluizione è di 1:400, che permette una conta compresa tra 100 e $4,9 \times 10^5$ UFC, e si ottiene aggiungendo 0,1ml di campione a 3,9ml di terreno ricostituito Il flacone è stato quindi sottoposto ad agitazione mediante Vortex per 3 secondi così da permettere una perfetta distribuzione ed omogeneizzazione tra terreno e campione. Il terreno di cultura inoculato e le card TEMPO® sono state inserite all'interno della stazione TEMPO® Filler seguendo le istruzioni del produttore. La stazione di preparazione TEMPO® Filler è composta da un rack in grado di accogliere 6 TEMPO® card e 6 flaconcini di terreno inoculati e dall'apparato che provvede al trasferimento del terreno inoculato nelle card e alla loro sigillatura. Per ogni terreno inoculato è stata disposta una card. Le card sono state riempite in maniera automatizzata con un volume adeguato di terreno inoculato. Le card riempite e sigillate dall'apparato TEMPO® Filler sono state poste in

incubazione a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ per 22-27 ore. Il tempo di incubazione è gestito dal software TEMPO® e tiene conto dei tempi di preparazione e inoculazione del terreno. Al termine dell'incubazione le card TEMPO® sono state inserite nella stazione di lettura. La lettura avviene in maniera automatizzata e il risultato è espresso in UFC su g o ml di prodotto iniziale. Lo schema di lavoro è riassunto nel grafico in figura 7.

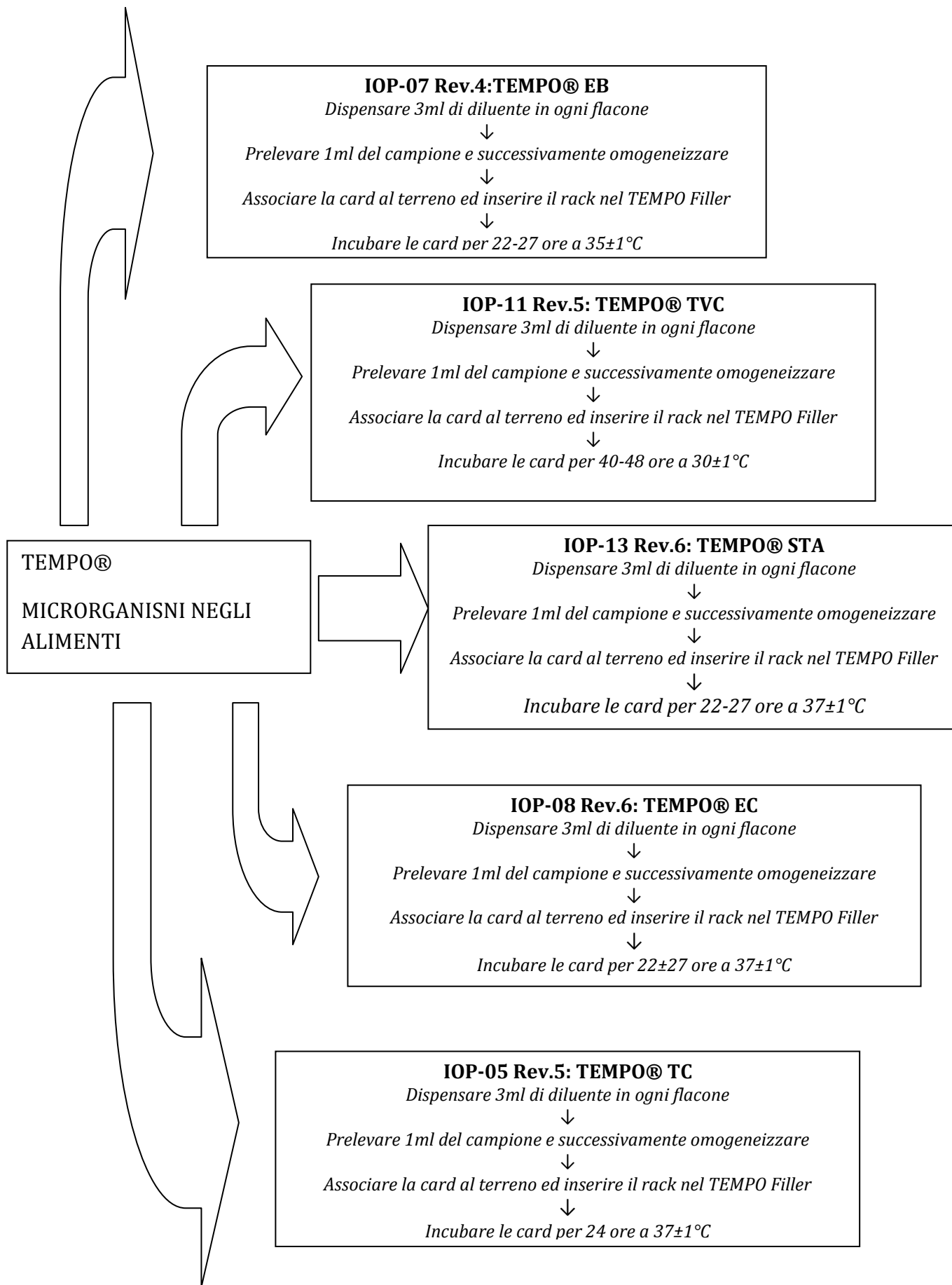


Figura 7: schema riassuntivo dei passaggi per eseguire le diverse analisi mediante la tecnica TEMPO® inserito nelle procedure interne del laboratorio

2.5 Taratura degli strumenti

La stima dell'esattezza, il secondo parametro calcolato ai fini della validazione secondaria della tecnica TEMPO®, è stata condotta confrontando i risultati ottenuti con la tecnica TEMPO® con quelli ottenuti sullo stesso campione e nelle stesse condizioni operative ma con la ISO di riferimento (ISO 16140:2003). Dovendo operare tale confronto abbiamo in via preliminare accertato le capacità tecniche dell'operatore nell'eseguire le prove microbiologiche mediante la tecnica ISO. Questo passaggio è stato necessario al fine di rendere confrontabile il valore ottenuto con la tecnica ISO di riferimento con quello ricavato dalla tecnica TEMPO®. Solo dopo aver valutato le capacità dell'operatore, si può procedere con il confronto tra la tecnica ISO di riferimento e la tecnica TEMPO® e quindi calcolare l'esattezza di quest'ultima (ISO 14461-1:2005). Oltre alla verifica dell'operatore è stata condotta la taratura di tutte le apparecchiature utilizzate nelle diverse analisi, come previsto dalla norma ISO 7218:2007 e 17025:2005.

Di seguito sono riportati alcuni esempi di tarature della strumentazione utilizzata all'interno del laboratorio Fratini, in particolare ci siamo soffermati sulla taratura degli strumenti associati alla tecnica TEMPO®. Questi rispetto a tutta la strumentazione presente in laboratorio, sono piuttosto limitati dato che il metodo è per lo più automatizzato (tabella5).

Le apparecchiature termoregolabili, come ad esempio i termostati, devono mantenere nel tempo le temperature di esercizio e di questo ne deve essere fornita evidenza. Nel caso dei termostati ad esempio il requisito richiesto allo strumento è il raggiungimento di un certo valore di temperatura e la limitazione delle oscillazioni del valore entro un range prefissato (SIT Italia 2001).

Tabella5: Elenco degli strumenti sottoposti a taratura ed associati alle analisi con la tecnica TEMPO®. Per ogni strumento è riportato il codice identificativo e la procedura operativa interna al laboratorio per effettuarne la taratura.

	CODICE STRUMENTO	PROCEDURA DI RIFERIMENTO
Autoclave	AP-08	IOV-04
Termostato a 30°C	AP-20	IOV-06
Termostato a 37°C	AP-21	IOV-06
Termostato a 35°C	AP-25	IOV-06
Bilancia tecnica	AP-13	DOC/PG-03/02
Stomaker	AP-42	DOC/PG-03/02
TEMPO® Reader	AP-63	MANUALE TEMPO®
TEMPO® Filler	AP-62	MANUALE TEMPO®

2.5.1 Autoclave

L'autoclave, identificata con il codice AP-08, è uno degli strumenti più importanti all'interno di un laboratorio (ISO 7218:2007). Essa deve garantire la sterilità dei terreni utilizzati sia nelle procedure classiche che nella tecnica TEMPO®; per questo necessita di controlli periodici (ISO 7218:2007). Come riportato nel documento PG-03 (Laboratori Fratini 2012) la presente apparecchiatura è sottoposta alla seguente manutenzione:

- ordinaria, eseguendo ogni 4 mesi la verifica dell'integrità della guarnizione del coperchio ed il suo ingrassaggio;
- operativa, attraverso il rabbocco del livello dell'acqua deionizzata nella caldaia dell'autoclave fino ad emergere la parte inferiore del cestello

Il programma di taratura prevede che la presenta apparecchiatura sia sottoposta alla verifica dell'efficacia del ciclo di sterilizzazione con modalità chimica e microbiologica

La verifica chimica è effettuata verificando il viraggio di tutti nastri indicatori chimici applicati ai contenitori. La verifica microbiologica invece è eseguita verificando la morte delle spore (*Bacillus stearothermophilus*) sottoposte a sterilizzazione. Questa procedura prevede:

L'introduzione nella camera di sterilizzazione, in posizioni differenti, di due fialette in vetro contenente sospensione di spore di *Bacillus Stearothermophilus* (codice ATCC 7953) e terreno nutritivo con indicatore di viraggio, aventi lo stesso numero di lotto;

Una terza fialetta, avente lo stesso numero di lotto, non è sottoposta a trattamento di sterilizzazione per costituire il controllo positivo al fine di accertare la vitalità delle spore e le corrette prestazioni del terreno nutritivo;

- Ultimato il ciclo di sterilizzazione programmato le 3 fialette vengono incubate a 55-50°C per 24-48 ore;
- Le due fiale sottoposte a trattamento devono rimanere invariate, mentre nella terza si deve osservare viraggio nel colore del terreno.

Tali controlli devono essere eseguiti con una certa frequenza; in particolare la verifica chimica deve essere effettuata ad ogni uso, mentre il controllo microbiologico con frequenza trimestrale (Laboratori Fratini 2010c).

2.5.2 Termostati

Tra le apparecchiature più utilizzate ci sono anche i termostati. All'interno del laboratorio sono presenti termostati a temperature differenti, per tutti le modalità di controllo e sanificazione sono le stesse. Questi sono identificati con i codici AP-21, AP-20 e AP-25. Ogni due mesi queste apparecchiature devono essere sottoposte a sanificazione come riportato nel documento interno IOV-06 (Laboratori Fratini 2010d). Per le superfici di lavoro, incubatori, frigoriferi, armadi e cappa la verifica dell'efficacia della disinfezione si esegue utilizzando una piastra Contact® che contiene il terreno PCA(Plate Count Agar) solidificato. Questa piastra va posizionata all'interno dell'attrezzatura da testare, possibilmente nella zona centrale. Innanzitutto si toglie il coperchio e si capovolge la piastra in modo tale che la superficie del terreno poggi sulla superficie da testare. Si tiene premuto per una decina di secondi e successivamente la piastra va richiusa. Per tutti i casi in cui risulta difficile utilizzare la piastra Contact®, ad esempio nelle apparecchiature dove non ci sono dei ripiani ma delle griglie, e quindi non è possibile far aderire la piastra sulla superficie, si impiega una piastra Petri contenente PCA solidificato. Tale piastra viene lasciata all'interno dell'attrezzatura senza coperchio per 15 minuti. Terminati questi passaggi si procede prima all'incubazione a $22\text{ °C} \pm 1$, per $68\text{ h} \pm 4$ e poi all'enumerazione delle colonie cresciute sulla piastra.

I valori limite sono:

u.f.c/piastra < 5 per superfici

u.f.c/m³ < 200 per locali

Il controllo delle temperature viene invece effettuato in continuo. Grazie ad una sonda collegata ad un computer, le temperature vengono campionate e registrate ogni ora. Il sistema di registrazione, inoltre, segnala eventuali cambi di temperatura. Le sonde, utilizzate per il monitoraggio delle temperature dei termostati, vengono a loro volta sottoposti a taratura da parte di un organismo esterno (SIT Italia 2001). Il vantaggio di questo sistema risiede nel fatto che tutto è automatizzato e non richiede quindi fogli cartacei da compilare manualmente. L'unico passaggio manuale è la firma del documento di controllo che certifica che ogni mattina il responsabile qualità del laboratorio abbia verificato i valori registrati dal programma (figura8).

Verifica Temperature software AP10

	FEBBRAIO	MARZO	APRILE	MAGGIO
1		OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	
2			OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
3			OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
4		OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	
5		OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	
6		OK <i>VF</i>		OK <i>VF</i>
7		OK <i>VF</i>		OK <i>VF</i>
8		OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
9			OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
10			OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
11		OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	
12		OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	
13	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>		OK <i>VF</i>
14	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>		OK <i>VF</i>
15	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
16			OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
17			OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
18	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	
19	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	
20	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>		OK <i>VF</i>
21	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>		OK <i>VF</i>
22	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
23			OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
24			OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
25	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>		
26	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>		
27	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>		OK <i>VF</i>
28	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>		OK <i>VF</i>
29	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
30			OK <i>VF</i>	OK <i>VF</i>
31				OK <i>VF</i>

Figura8: documento di controllo che certifica che ogni mattina il responsabile qualità del laboratorio abbia verificato i valori registrati dal programma

2.5.3 Bilancia tecnica

Strumento fondamentale per qualsiasi tipologia di analisi, è la bilancia da noi codificata con AP-13. Come riportato nel documento PG-03 (Laboratori Fratini 2012), la manutenzione

dello strumento, che deve essere effettuata prima di ogni uso, consiste nel verificare che la bilancia sia in bolla e che il piatto di pesata risulti pulito. Se ciò non si verifica è necessario effettuare una pulizia approfondita attraverso l'utilizzo di un pennello a setole morbido.

Il programma di taratura é diviso in due fasi:

1. taratura presso un centro SIT (Servizio di taratura in Italia) o riconosciuto dal SIT

Campo e punti di taratura: da 0 a 600 g su 10 punti (escluso lo 0)

da 0 a 4000 su 10 punti (escluso lo 0)

Questo tipo di controllo viene eseguito con frequenza annuale ed i limiti di accettazione utilizzati sono:

Eccentricità:	$\Delta \max < 0,02 \text{ g}$, per campo $< 600 \text{ g}$
	$\Delta \max < 0,1 \text{ g}$, per campo $600 \div 4000 \text{ g}$
Ripetibilità:	$S < 0,02 \text{ g}$ per campo $< 600 \text{ g}$
	$S < 0,1 \text{ g}$ per campo $600 \div 4000 \text{ g}$
Esattezza (correzioni):	$\leq 0,01 \text{ g}$ per campo $< 600 \text{ g}$
	$\leq 0,05 \text{ g}$ per campo $600 \div 4000 \text{ g}$
U estesa:	$< 0,02 \text{ g}$ per campo $< 600 \text{ g}$
	$< 0,5 \text{ g}$, per campo $600 \div 4000 \text{ g}$

2. Ogni primo giorno settimanale invece viene eseguita una taratura rilevando il valore della massa sotto riportata. Questa viene posta, indossando guanti in cotone, al centro del piatto. La massa campione interna è di 100 g. Tutte le misure effettuate sono riportate sul modulo di riferimento che è visibile in Figura9.

CARTA DI CONTROLLO		MO/000/01																																																																																	
Parametro: CONTROLLO TARATURA BILANCIA TECNICA AP13		Rev I																																																																																	
Carta nr.: 1	Riferimento: AP 29	Val. max.: g	Val. min.: g																																																																																
Anno: 2013																																																																																			
<table border="1"> <thead> <tr> <th>DATA</th> <th>10/01</th><th>14/01</th><th>21/01</th><th>28/01</th><th>04/02</th><th>11/02</th><th>18/02</th><th>25/02</th><th>03/03</th><th>10/03</th><th>17/03</th><th>24/03</th><th>31/03</th><th>07/04</th><th>14/04</th><th>21/04</th><th>28/04</th><th>05/05</th><th>12/05</th><th>19/05</th><th>26/05</th><th>02/06</th><th>09/06</th><th>16/06</th><th>23/06</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NOTE</td> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> <tr> <td>OPERATORE</td> <td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td><td>UR</td> </tr> </tbody> </table>				DATA	10/01	14/01	21/01	28/01	04/02	11/02	18/02	25/02	03/03	10/03	17/03	24/03	31/03	07/04	14/04	21/04	28/04	05/05	12/05	19/05	26/05	02/06	09/06	16/06	23/06	NOTE																											OPERATORE	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR
DATA	10/01	14/01	21/01	28/01	04/02	11/02	18/02	25/02	03/03	10/03	17/03	24/03	31/03	07/04	14/04	21/04	28/04	05/05	12/05	19/05	26/05	02/06	09/06	16/06	23/06																																																										
NOTE																																																																																			
OPERATORE	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR	UR																																																									

Figura9: Modulo per la registrazione, con frequenza settimanale, dell'avvenuta taratura della bilancia

2.5.4 Taratura apparecchiature TEMPO®

La strumentazione TEMPO® necessita di una taratura periodica ad entrambe le stazioni, TEMPO® Reader e TEMPO® Filler. Questa viene effettuata con frequenza annuale dal costruttore.

2.6 Verifica dell'idoneità tecnica del personale

2.6.1 Criteri per l'accettabilità della ripetibilità e della proporzionalità dell'inoculo

Un laboratorio che opera in Qualità, secondo quanto previsto dalla ISO 17025:2005, deve assicurarsi che tutto il suo personale sia adeguatamente addestrato a svolgere le analisi secondo i metodi di prova accreditati o che si vogliono accreditare (ISO 17025:2005, ISO 7218:2007). Nella pianificazione del processo di validazione della tecnica TEMPO® è stata programmata una fase di verifica delle capacità tecniche degli operatori, in relazione all'uso delle tecniche ISO di riferimento. Per verificare l'abilità dell'operatore abbiamo valutato la ripetibilità e la proporzionalità dell'inoculo e la ripetibilità nell'eseguire il conteggio (Codega 2005, ISO 14461-1:2005).

Dovendo valutare le capacità di un operatore già idoneo alla mansione, la ripetibilità e

proporzionalità dell'inoculo sono state condotte verificando i conteggi di prove effettuate su campioni derivanti dalle normali attività di laboratorio (Codega 2005, Ballati 2004). La lista dei campioni analizzati, i cui risultati sono stati utilizzati ai fini della validazione sono riportati in tabella 1a e 1b.

Per il calcolo della ripetibilità dell'inoculo ogni prova è consistita nell'effettuare due conteggi su una stessa piastra in tempi diversi nel corso della stessa mattina e in condizioni di "anonimato" che si rinnovano ad ogni lettura. La ripetibilità di conteggio dell'operatore è stata calcolata mediante la valutazione dell'indice di dispersione sperimentale G_{n-1}^2 , calcolato come segue (Codega 2005, Ballati 2004, ISO 14461-1:2005, Lazzerini e Tinti 2012):

$$G_{n-1}^2 = 2 * \left[\sum (c_i \ln c_i) - \left(\sum c_i \right) \ln \left(\frac{\sum c_i}{n} \right) \right] \leq \chi_{p;n-1}^2$$

dove:

c_i è il valore del conteggio riscontrato nella capsula i .

n è il numero delle osservazioni

L'indice di dispersione sperimentale, G_{n-1}^2 viene confrontato con l'indice di dispersione limite riportato nelle apposite tabelle, $\chi_{p;n-1}^2$ (per $n-1$ gradi di libertà e per un livello di probabilità, p) (Codega 2005, Ballati 2004 e ISO 14461-1:2005).

Nella tabella 6 sono riportati i valori di $\chi_{p;n-1}^2$ per i gradi di libertà sino a $n-1=7$ e per i livelli di probabilità, p , più utilizzati, che sono di regola 0,95 e 0,99.

Tabella 6. Valori di $\chi_{p;n-1}^2$ per i gradi di libertà fino a $n-1=7$ e probabilità $p=0,95$ e $p=0,99$

$n-1$ p	1	2	3	4	5	6	7
0.95	3.841	5.991	7.815	9.488	11.071	12.592	14.067
0.99	6.635	9.210	11.345	13.277	15.086	16.812	18.475

Per calcolare i gradi di libertà occorre sottrarre 1 al numero di piastre per replica.

Confrontando l'indice di dispersione sperimentale G_{n-1}^2 , con quello tabulato $\chi_{p;n-1}^2$ si possono verificare i tre casi riportati in tabella 7

Tabella 7: in questa tabella sono riportati i tre casi limite che si possono verificare nel calcolo del G_{n-1}^2 e le possibili azioni correttive (Codega 2005, Lazzerini e Tinti 2012).

1	$G_{n-1}^2 \leq \chi_{p;n-1}^2$	<i>I conteggi sono accettabili</i> ed è possibile esprimere il risultato come media delle n prove in parallelo
2	$\chi_{p;n-1}^2 < G_{n-1}^2 \leq \chi_{p;n-1}^2$	<i>La compatibilità tra i conteggi deve essere considerata critica</i> e meritevole di approfondimento prima di esprimere il risultato delle n prove di parallelo
3	$G_{n-1}^2 \geq \chi_{p;n-1}^2$	<i>La compatibilità tra i conteggi deve essere considerata insufficiente</i> e le prove in parallelo non possono essere considerate valide

Se l'indice di dispersione sperimentale calcolato rientra nel criterio 2, esposto nella tabella 7, i conteggi sono da considerarsi critici e quindi non ripetibili.

Per quanto riguarda il calcolo della proporzionalità dell'inoculo si sono utilizzate le diluizioni già effettuate durante l'attività routinaria di analisi dei campioni in laboratorio (Codega 2005, Ballati 2004 e ISO 14461-1:2005).

Il criterio per giudicare se sussiste proporzionalità nell'inoculo eseguito dall'operatore, è stato calcolato secondo la seguente formula (Codega 2005, Lazzerini e Tinti 2012, ISO 14461-1:2005):

$$G_{sper}^2 = 2 \cdot \left[\sum_{i=1}^m \left(C_i \ln \frac{C_i}{R_i} \right) - \left(\sum_{i=1}^m C_i \right) \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^m C_i}{\sum_{i=1}^m R_i} \right) \right] \leq \chi_{p;n-1}^2$$

dove:

C_i sono i la somma dei conteggi sullo stesso campione ai rispettivi rapporti di diluizione R_i .

Per calcolare il $\chi_{p;n-1}^2$ si è utilizzata la tabella 6 con un livello di probabilità $p = 0,95$, dove i gradi di libertà sono stati calcolati facendo il numero delle diluizioni -1.

2.4.2 Esecuzione prove per la valutazione della ripetibilità del conteggio

Per verificare la ripetibilità del conteggio sono state fatte esaminare per più volte, nel corso della stessa mattinata, una serie di piastre, che comprendevano sia terreni per i quali è

prevista l'identificazione morfologica (4 terreni, 5 campioni) sia terreni per i quali non è prevista identificazione morfologica in fase di lettura (1 terreno, PCA, 5 campioni).

Tali piastre sono state scelte tra quelle con una contaminazione compresa tra 15 e 300 colonie. Su ogni serie di conte della stessa piastra effettuate dall'operatore viene calcolata la media, lo scarto tipo e lo scarto tipo relativo (Codega 2005, ISO 14461-1:2005, Vargiolu 2012).

Abbiamo eseguito i calcoli utilizzando le seguenti formule:

$$\text{Media: } \bar{C}_m = \frac{C_1 + C_2}{2}$$

$$\text{Varianza: } s_i^2 = \sum (C_i - C_m)^2$$

$$\text{Scarto tipo: } s = \sqrt{\frac{\sum (C_i - \bar{C})^2}{n-1}}$$

$$\text{Scarto tipo relativo: } u_i = \frac{s}{C}$$

$$\text{Scarto tipo relativo quadratico: } u_i^2 = (u_i)^2$$

La ripetibilità di conteggio dell'operatore coinvolto nell'esecuzione di test per la validazione della tecnica TEMPO® è stata calcolata mediante la verifica della media quadratica degli scarti tipo relativi alle singole serie di conte ed è stata determinata attraverso il calcolo della media quadratica degli scarti tipo di ripetibilità (STR) ottenuti nelle singole prove, grazie alla formula (Codega 2005, Lazzerini e Tinti 2012):

$$u_A^2 = \sqrt{\frac{\sum u_i^2}{n}}$$

I criteri di accettabilità della ripetibilità del conteggio dell'operatore sono i seguenti (Codega 2005):

- a) per le conte effettuate su piastre in cui il conteggio non prevede l'interpretazione della tipicità della colonia, le prestazioni dell'operatore sono considerate accettabili se:

$$\mathbf{u_{(operatore)} < 0,02}$$

b) per le conte effettuate con interpretazione della tipicità delle colonie, le prestazioni dell'operatore sono considerate accettabili se:

$$u_{(\text{operatore})} < 0,1$$

Quando si ottengono valori di ripetibilità che non soddisfano i criteri sopra riportati occorre verificare se esistano delle varianze anomale ottenute dall'operatore applicando il Test di Cochran (ISO 5725-2). Il vantaggio di questo test è la capacità di rilevare la presenza di una varianza significativamente maggiore rispetto alle altre, andando a verificare che le varianze ottenute rispettino il seguente criterio (ISO 5725-2):

$$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_k s_{k,j}^2} \leq C_{p,k,v}$$

Il valore di C viene confrontato con quello $C_{p,k,v}$, tabulato a un determinato livello di probabilità p (normalmente $p=0.95$), con gradi di libertà $v=n_j-1$, dove n_j è il numero di letture effettuate sulle singole capsule, con k il numero globale di capsule prese in considerazione. Nel nostro caso i criteri per la verifica della ripetibilità di conteggio sono risultati accettabili, quindi non è stato necessario applicare il test di Cochran.

2.6 Validazione secondaria della tecnica TEMPO®

Nel nostro lavoro abbiamo eseguito una validazione secondaria della tecnica TEMPO® per la conta diretta degli indicatori di qualità nei prodotti alimentari.

I parametri analizzati al fine di valutare e garantire l'adeguatezza del laboratorio al nuovo metodo TEMPO® sono stati precisione ed esattezza, due componenti dell'accuratezza.

Secondo la norma ISO 5725-1:2004 per accuratezza si intende il grado di accordo tra il risultato di un procedimento analitico ed il valore di riferimento accettato.

Il primo parametro che abbiamo valutato è stata la precisione.

Per precisione si intende il grado di accordo tra risultati indipendenti ottenuti con un procedimento di analisi in condizioni ben specifiche (Ballati 2004, ISO 5725-1:2004, ISO 16149:2003).

La precisione si suddivide in tre tipi (Ballati 2004, ISO 5725-1:2004, ISO 16140:2003):

- **Ripetibilità:** congruenza fra risultati di due successive determinazioni relative ad un identico campione, condotte nelle stesse condizioni analitiche.
- **Riproducibilità:** congruenza fra risultati di determinazioni eseguite su un identico campione condotte in condizioni analitiche diverse.

- **Precisione intermedia**

Al fine di confrontare le prestazioni del laboratorio con quelle dichiarate nel metodo ufficiale, o come nel nostro caso specifico quelle riportate nel certificato di validazione, si è proceduto a determinare lo scarto tipo di ripetibilità (ISO 16140:2003).

La determinazione della ripetibilità può essere effettuata sia su campioni naturalmente contaminati che su campioni contaminati in laboratorio. Nel nostro caso sono stati utilizzati campioni naturalmente contaminati la cui positività era stata precedentemente accertata con i metodi ufficiali (ISO) Per il conteggio degli stafilococchi coagulasi positivi si è resa necessaria la contaminazione artificiale.

Per valutare la ripetibilità abbiamo deciso di valutare per ogni metodo quantitativo TEMPO® e per le 2 categorie di matrici (categoria II e categoria IV) lo scarto tipo di ripetibilità per almeno 10 misurazioni in condizioni di ripetibilità stretta. Per ripetibilità stretta si intende la condizione nelle quali i risultati di prove indipendenti sono stati ottenuti con lo stesso metodo su un identico materiale, nello stesso laboratorio, dallo stesso operatore usando la stessa apparecchiatura ed in intervalli di tempo brevi (ISO 5725-1:2004, ISO 16140:2003).

Per ciascun campione, l'operatore prende una porzione per la prova, e prepara da essa almeno 10 sospensioni iniziali che analizza con il metodo TEMPO®. La sospensione iniziale è preparata per ogni metodo TEMPO® come indicato nel capitolo 2.3 e in appendice.

Una volta ottenuti i risultati e averne verificato l'attendibilità mediante i test di Huber e di Shapiro-Wilk, abbiamo proceduto all'elaborazione dei dati calcolando lo scarto tipo di ripetibilità sperimentale S_r . Prima di effettuare il calcolo abbiamo convertito i risultati dei conteggi microbiologici in \log_{10}

Lo scarto tipo di ripetibilità è stato calcolato secondo la formula(ISO 16140:2003, Accredia 2007, Lazzerini e Tinti 2012, Vargiolu 2012):

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

dove:

S_r =scarto tipo di ripetibilità

x_i = i-esimo risultato espresso come logaritmo decimale

\bar{x} = media aritmetica degli i-esimi risultati

n = numero di prove eseguite (almeno ≥ 10)

Lo scarto tipo di ripetibilità sperimentale S_r è stato confrontato con lo scarto tipo di ripetibilità del metodo, σ_r riportato nel protocollo di validazione fornito dalla ditta BioMérieux.

La verifica viene effettuata calcolando il rapporto S_r/σ_r e valutando se il risultato ottenuto cade all'interno dell'intervallo riportato in tabella 8 in corrispondenza del numero di gradi di libertà $n = n-1$, che nel nostro caso, avendo effettuato 10 prove, corrisponde a 9 (Accredia 2007, ISO 16140:2003).

Tabella 8. intervalli previsti del Documento tecnico DT 0002/6 (Accredia 2007) "Limiti di fiducia minimi ($p=0.025$) e massimi ($p=0.975$) del rapporto s/σ in funzione dei gradi di libertà, $v=n-1$, dove n è il numero delle prove"

$v=n-1$	Valore minimo $p=0,025$	Valore massimo $p=0,975$
1	0,0316	2,241
2	0,160	1,921
3	0,268	1,765
4	0,348	1,699
5	0,408	1,602
6	0,454	1,551
7	0,491	1,512
8	0,522	1,460
9	0,548	1,454
10	0,570	1,431
11	0,560	1,412
15	0,645	1,354
20	0,692	1,307
25	0,724	1,275
30	0,748	1,251

Lo scarto tipo di ripetibilità S_r viene anche utilizzato per verificare il metodo di prova nel tempo, attraverso l'esecuzione di prove in doppio, elaborate secondo la formula (Ballati 2004):

$$|x_1 - x_2| \leq \sqrt{2} * s_r * t_{p=1-\alpha; v=n-1}$$

dove:

S_r =scarto tipo di ripetibilità

x_1 e x_2 = primo e secondo risultato della prova sullo stesso campione

t = valore della variabile t di Student

Il secondo membro dell'equazione rappresenta il limite dell'intervallo di ripetibilità per una prova in doppio nelle condizioni adottate (Accredia 2007)

La stima della precisione di un metodo deve iniziare sempre con prove eseguite in condizioni di ripetibilità stretta, perché l'acquisizione del dato di scarto tipo di ripetibilità sperimentale è fondamentale sia ai fini della validazione del metodo che nel processo di controllo nel tempo del metodo (Accredia 2007).

Al fine della valutazione della tecnica TEMPO® sono stati utilizzati materiali di prova certificati e/o preparati dal laboratorio, rappresentativi delle prestazioni del metodo che siamo andati ad analizzare (campo d'applicazione e campo di misura).

La seconda componente dell'accuratezza è l'esattezza. Con esattezza si intende il grado di accordo tra il valore medio ottenuto da una larga serie di risultati ed il valore di riferimento accettato (ISO 5725-1:2004 e ISO 16140:2003, Ballati 2004).

Per verificare l'esattezza di un metodo analitico ci sono diverse procedure. Quella che abbiamo utilizzato consiste nel confrontare i risultati ottenuti con un metodo di riferimento, le cui prestazioni sono note o ritenute accettabili, con quelli ricavati con il metodo alternativo (Maiello 2006, Ballati 2004, ISO 16140:2003). A tal scopo abbiamo eseguito un'analisi per verificare la correlazione tra il metodo alternativo e il rispettivo metodo di riferimento mediante calcolo della regressione lineare, che valuta la probabilità che non vi sia perdita di correlazione o di linearità (Vargiolu 2012).

Per effettuare il confronto tra i due metodi mediante il calcolo della regressione lineare abbiamo utilizzato come materiali di partenza campioni contaminati naturalmente, provenienti dalle normali attività di analisi del laboratorio. Per quelle matrici in cui invece è difficilmente riscontrabile il microrganismo target si è proceduto a preparare dei campioni contaminati artificialmente come previsto dalla procedura riportata nel paragrafo 2.2. Le categorie alimentari analizzate sono state la II e la IV. Per ogni categoria abbiamo utilizzato due sottocategorie di alimenti. Nello specifico per la categoria II abbiamo utilizzato preparazioni a base di carne e prodotti 4 gamma (verdure in busta), mentre per la categoria IV abbiamo analizzato campioni di formaggi e campioni di gastronomia. Per ogni tipologia di alimento sono stati analizzati 10 campioni diversi. I microrganismi ricercati sono quelli

previsti dai metodi TEMPO® sottoposti a validazione, e cioè Coliformi totali, Stafilococchi coagulasi positivi, *Escherichia coli*, Enterobatteri e Microrganismi a 30°C.

Al fine di ridurre al minimo la disomogeneità, le fasi iniziali del processo di prova (omogeneizzazione, pre-arricchimento) sono state condotte in comune tra il metodo di riferimento e il metodo sotto studio. Il processo è diviso immediatamente prima della separazione delle fasi analitiche (ISO16140:2003)

Una volta ottenuti i risultati delle misurazioni e prima di effettuare qualsiasi tipo di calcolo abbiamo trasferito su un grafico bidimensionale i valori dei risultati del metodo di riferimento e di quello alternativo di ciascun campione, utilizzando l'asse *y* (verticale) per il metodo alternativo e l'asse *delle x* (orizzontale) per il metodo di riferimento. I punti di ciascuna concentrazione costituiscono un raggruppamento discreto (ISO 16140:2003).

Al fine di rilevare punti fuori quota o una condizione di non linearità, abbiamo verificato il grafico per la presenza di risultati anomali, che sono rappresentati da quei punti che si discostano in modo evidente da ciascun raggruppamento (ISO 16140:2003). Quando abbiamo rilevato dati anomali abbiamo ripetuto, se era possibile, la prova sullo stesso campione e, se non si individua una spiegazione razionale o il risultato si collocava nuovamente al di fuori di un raggruppamento, abbiamo scartato questo risultato e abbiamo ripetuto i calcoli per valutare il suo impatto nei confronti di tutte le valutazioni dei dati complessivi.

Successivamente alla verifica dei dati mediante la costruzione di grafici a dispersione è stato valutata la correlazione. La correlazione esprime la "forza" di legame tra due variabili, in questo caso i risultati ottenuti mediante la tecnica TEMPO® e quelli rispettivi ottenuti con la tecnica ISO di riferimento (Vargiolu 2012). L'analisi di correlazione si misura mediante l'indice di Bravais-Pearson, detto indice di correlazione lineare "r" (Vargiolu 2012, Ronzon 2005).

Per il calcolo del coefficiente di correlazione abbiamo applicato la seguente formula (Vargiolu 2012):

$$r = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y}$$

Dove

X_i = logaritmo misurazione effettuata con la tecnica tempo di riferimento

Y_i = logaritmo misurazione effettuata con la tecnica tempo di riferimento

σ_{xy} = covarianza fra x e y, calcolata come $\sigma_{xy} = \frac{\sum_1^n x_i y_i}{n}$

σ_x = varianza di x, calcolata come $\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum(x_i)^2}{n}}$

$$\sigma_y = \text{varianza di } y, \text{ calcolata come } \sigma_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i)^2}{n}}$$

Il parametro r può assumere valori compresi tra -1 e 1 . In particolare se $r > 0$, la correlazione è *diretta o positiva*, se $r < 0$ la correlazione è *inversa o negativa*, se $r = 1$ la correlazione è *perfetta diretta*, se $r = -1$ la correlazione è *perfetta inversa*. Se $r = 0$ invece non c'è correlazione tra le due variabili (Casa 2003).

Conseguente al calcolo della correlazione abbiamo effettuato lo studio della regressione.

La regressione che abbiamo applicato ai dati è una regressione lineare semplice, infatti le variabili che entrano in gioco sono la variabile dipendente y (corrispondente alle misurazioni effettuate con la tecnica TEMPO®) e una sola variabile indipendente x (misurazioni effettuate con tecnica ISO) e la relazione che lega le variabili è una retta con equazione del tipo (Vargiolu 2012):

$$y = a + bx$$

In cui

a = intercetta

b = coefficiente angolare

Non esiste alcuna imprecisione sistematica (ovvero esiste una accuratezza ideale) fra i due metodi se questa equazione è espressa dalla formula $y = x$, ottenuta in condizione di equivalenza dei due metodo. L'intercetta è teoricamente nulla in questo modello teorico.

L'inclinazione teorica della linea fra i punti che hanno prodotto una completa equivalenza è uguale a uno. L'inclinazione di b , generata dai due metodi, dovrà essere verificata per $p(b = 1)$. Se il metodo alternativo non fornisce in modo significativo gli stessi valori di quello di riferimento, la probabilità $p(b = 1)$ è allora inferiore ad $\alpha = 0.05$. In questi casi, il metodo alternativo ha un'imprecisione rispetto al metodo di riferimento (ISO 16140:2003).

Ai fini della nostra analisi abbiamo valutato solo l'inclinazione, b .

Per calcolare il coefficiente angolare di ogni serie di misurazioni abbiamo utilizzato la seguente espressione (Vargiolu 2012):

$$b = \frac{S_{XY}}{S_X^2}$$

Dove:

s_{XY} è una stima di covarianza tra x e y ed è calcolata come:

$$s_{XY} = \frac{1}{n-1} \sum_1^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})$$

S_x^2 corrisponde alla varianza campionaria della variabile x

\bar{x} e \bar{y} corrispondono alle medie campionarie

x_i corrispondono alle misurazioni effettuate con la tecnica ISO e y_i quelle effettuate con la TEMPO®.

Una volta calcolato il coefficiente b abbiamo proceduto a stimare la variabilità intorno alla retta di regressione tramite la determinazione dello stimatore $s_{X|Y}$, detto stima della deviazione standard del rumore. Tale parametro è necessario per calcolare l'errore standard del coefficiente di regressione b (Vargiolu 2012).

Lo stimatore $s_{X|Y}$ si calcola come segue:

$$s_{X|Y} = \sqrt{\frac{n-1}{n-2} (s_Y^2 - b^2 s_X^2)}$$

Dove:

S^2_Y corrisponde alla varianza campionaria della variabile Y .

Essendo il coefficiente b una stima che dipende dal campione, si può sapere quanto esso risulta accurato, calcolando l'errore standard associato ad esso.

Il coefficiente b segue legge gaussiana. Per calcolare l'errore standard del coefficiente angolare abbiamo utilizzato la formula sotto riportata (Vargiolu 2012)

$$s_b = \frac{1}{\sqrt{n-1}} \frac{s_{X|Y}}{s_X}$$

L'ultimo passaggio è la determinazione degli intervalli di confidenza e quindi effettuare il test di ipotesi sul coefficiente angolare, o di regressione, b .

L'ipotesi che siamo andati a verificare è $H_0: \beta=0$, cioè che non esista una dipendenza lineare tra i due metodi TEMPO® e ISO, e alternativa $H_1: \beta=1$ e cioè che esista una dipendenza lineare tra i due metodi. Il test lo abbiamo eseguito con un livello di probabilità $p=0,95$ (Vargiolu 2012).

Per verificare l'ipotesi abbiamo dapprima costruito la variabile t

$$t = \frac{b - \beta}{s_b}$$

Quindi abbiamo calcolato l'intervallo di confidenza di b al $100(1-\alpha)\%$. Per fare questo abbiamo ricavato il t tabulato per $v=n-2$ gradi di libertà (che nel nostro caso avendo effettuato 10 misurazioni per ogni sottocategoria corrisponde a 8) e $p=1-\alpha/2$.

L'intervallo di confidenza è ottenuto in questo modo:

$$b - t_{1-\alpha/2}(v) < \beta < b + t_{1-\alpha/2}(v)$$

Per verificare l'ipotesi nulla $H_0: \beta=0$, e cioè assenza di correlazione lineare tra i due metodi, bisogna controllare se β appartiene o meno all'intervallo di confidenza (Vargiolu 2012). Se non è compreso nell'intervallo di confidenza rifiutiamo l'ipotesi nulla e quindi si può concludere che c'è una dipendenza lineare tra i due metodi TEMPO® e ISO.

Per eseguire tutti i test statistici e calcolare la regressione lineare e il coefficiente di correlazione abbiamo utilizzato un apposito foglio Excel precedentemente utilizzato dal laboratorio per i normali test statistici sui risultati e in fase di accreditamento, denominato MO-PG10_01. Anche questo foglio Excel è accreditato.

2.6.1 Test di Huber

Il test di Huber è uno dei mezzi statistici più efficaci per eliminare i dati anomali (Ballati 2004)

Per individuare i dati anomali, se presenti, abbiamo proceduto nel modo seguente (Ballati 2004):

- a) Abbiamo calcolato la mediana (C_m) dei conteggi C_i ordinati in senso crescente;
- b) Si calcolano le differenze (D_i) tra i singoli conteggi e la mediana (C_m), $D_i=C_i-C_m$;
- c) Si ordinano le differenze (D_i), in valore assoluto, in senso crescente;
- d) Si calcola la mediana (D_m) delle differenze.
- e) Si confrontano le differenze D_i rispetto a D_m applicando la relazione $D_i \leq 4,5 \times D_m$;

$$\text{Valore accettabile } \frac{D_i}{D_m} \leq 4,5;$$

$$\text{Valore non accettabile } \frac{D_i}{D_m} \geq 4,5$$

Nel nostro lavoro il test di Huber è stato utilizzato per rimuovere i dati anomali dalle serie di misurazioni utilizzate per il calcolo della ripetibilità

2.6.2 Test di Shapiro-Wilk

Il test di Shapiro-Wilk è un test per la verifica di ipotesi statistiche ed è utilizzato per la verifica della normalità (Shapiro e Bradbury 1965). In tal senso in teoria della probabilità la distribuzione normale, o di Gauss, è una distribuzione di probabilità continua che è spesso usata come prima approssimazione per descrivere variabili casuali a valori reali che tendono a concentrarsi attorno a un singolo valor medio (Shapiro e Bradbury 1965). Il grafico della funzione di densità di probabilità associata è simmetrico e ha una forma a campana, nota come Campana di Gauss. Entrando nello specifico dei calcoli, la verifica della normalità

avviene confrontando due stimatori alternativi della varianza σ^2 : uno stimatore non parametrico basato sulla combinazione lineare ottimale della statistica d'ordine di una variabile aleatoria normale al numeratore, e il consueto stimatore parametrico, ossia la varianza campionaria, al denominatore (Shapiro e Bradbury 1965).

$$W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)}\right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

dove

- $x_{(i)}$ (indice i incluso tra parentesi) è l' i -esimo valore più piccolo (rango i) del campione
- $\bar{x} = (x_1 + \dots + x_n)/n$ è la media aritmetica del campione
- e le costanti a_i sono date da

$$(a_1, \dots, a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}}$$

dove

$$m = (m_1, \dots, m_n)^T$$

e m_1, \dots, m_n sono i valori attesi dei ranghi di un numero casuale standardizzato, e V è la matrice delle covarianze di questi ranghi

Nella parte precedente abbiamo riportato le formule necessarie per la comprensione del test di Shapiro-Wilk, ma nel nostro caso ci è stato fornito, da un tecnico informatico, un foglio di lavoro ideato appositamente per il calcolo di entrambi i test statistici, in maniera tale da dare una risposta immediata sull'accettabilità dei risultati oppure sulla presenza di dati anomali e quindi sulla necessità di effettuare altre misurazioni. Il foglio è denominato MO-PG10_01.

2.6.3 Incertezza di misura

In un'analisi tradizionale un altro parametro che necessita di essere valutato è l'incertezza di misura (Maiello 2008, De Martin 2011, Spolaor 2011, Viti 2005b, ISO 19036:2006) Questo parametro, associato al risultato di una misurazione, caratterizza la dispersione dei valori che può essere ragionevolmente attribuita al misurando (De Martin 2011). Nel caso del metodo TEMPO® è opportuno considerare che si tratta di un metodo MPN

(most probable number) in cui per ogni combinazione di provette positive, si ottiene il relativo numero più probabile compreso in un intervallo di fiducia dal 95% al 99% di probabilità (Beliaeff e Mary 1993, De Man 1983, Cochran 1950). E' noto dalla letteratura che in microbiologia per rappresentare i risultati, sia adottano 2 modelli di distribuzione di probabilità (Spolaor 2011, Pepa e Scognamiglio 2013):

- Distribuzione di Poisson (per conteggi in piastra)
- Distribuzione binomiale (per tecnica MPN)

L'incertezza di misura è fondamentale nell'espressione dei risultati di prova, qui deve presentare la stessa unità di misura e le stesse cifre significative (Pepa e Scognamiglio 2013).

Nel caso della tecnica TEMPO® ,in quanto metodo automatizzato, l'incertezza non viene calcolata ma viene fornita direttamente dalla macchina la quale, facendo riferimento all'intervallo di probabilità e al valore calcolato ,permette di rilevare il limite di confidenza. In tal modo è tutto più semplice dato che è sufficiente scaricare i risultati ed inserirli nei rapporti di prova.

3 RISULTATI

Ai fini della validazione secondaria della tecnica TEMPO® abbiamo valutato i parametri precisione ed esattezza, due componenti della grandezza accuratezza. Nella Tabella 9a e nella Tabella 9b sono riassunti i risultati relativi all'analisi del parametro precisione; In tabella 9a, per ogni metodo TEMPO®, sono riportati i dati ottenuti da misurazioni effettuate su matrici alimentari appartenenti alle categoria II mentre nella tabella 9b sono riportati i dati per le matrici appartenenti alla categoria IV. Per ogni metodo è stato calcolato lo scarto tipo di ripetibilità sperimentale S_r il quale è stato confrontato con lo scarto tipo di ripetibilità del metodo σ_r . Il risultato del confronto è espresso come rapporto S_r/σ_r . In tabella 8 sono riportati i limiti di fiducia minimi ($p=0.025$) e massimi ($p=0.975$) del rapporto S_r/σ_r in funzione dei gradi di libertà, $v=n-1$, dove n è il numero delle prove. In tutti i casi il valore calcolato S_r/σ_r rientra all'interno dei limiti di fiducia (Tabella 9a e Tabella 9b).

Tabella 9a: Calcolo del parametro precisione per i diversi metodi TEMPO® mediante confronto tra scarto tipo di ripetibilità sperimentale S_r e quello fornito dal metodo σ_r . Gli alimenti analizzati appartengono alla categoria II.

METODO	N° PROVE EFFETTUATE	GRADI DI LIBERTA'	S_r	σ_r	S_r/σ_r	LIMITI DI FIDUCIA		Accettabilità
						minimo	massimo	
TEMPO® TC	10	$n-1$	0,254	0,440	0,576	0,548	1,454	Si
TEMPO® STA	10	$n-1$	0,282	0,352	0,802	0,548	1,454	Si
TEMPO® EC	10	$n-1$	0,305	0,352	0,868	0,548	1,454	Si
TEMPO® TVC	9	$n-1$	0,432	0,528	0,819	0,522	1,460	Si
TEMPO® EB	10	$n-1$	0,340	0,382	0,889	0,548	1,454	Si

S_r : scarto tipo di ripetibilità sperimentale, σ_r : scarto tipo di ripetibilità del metodo

Tabella 9b: Calcolo della precisione per i diversi metodi TEMPO® mediante confronto tra lo scarto tipo di ripetibilità trovato sperimentalmente S_r e quello fornito dal metodo. Gli alimenti analizzati appartengono alla categoria IV.

METODO	N° PROVE EFFETTUATE	GRADI DI LIBERTA'	S_r	σ_r	S_r/σ_r	LIMITI DI FIDUCIA		Accettabilità
						minimo	massimo	
TEMPO® TC	10	$n-1$	0,254	0,440	0,576	0,548	1,454	Si
TEMPO® STA	10	$n-1$	0,202	0,352	0,574	0,548	1,454	Si
TEMPO® EC	10	$n-1$	0,375	0,352	1,066	0,548	1,454	Si
TEMPO® TVC	9	$n-1$	0,453	0,528	0,553	0,522	1,460	Si
TEMPO® EB	10	$n-1$	0,379	0,382	0,993	0,548	1,454	Si

S_r : scarto tipo di ripetibilità sperimentale, σ_r : scarto tipo di ripetibilità del metodo

I risultati delle misurazioni effettuate mediante la tecnica TEMPO® ed utilizzati per ottenere lo scarto tipo di ripetibilità sperimentale S_r sono riportati, per la categoria II, nelle tabelle S1 a,b,c,d,e, mentre per la categoria IV nelle tabelle S2 a,b,c,d,e. Per ogni metodo sono state eseguite 10 misurazioni in replicato su campioni provenienti dalle analisi di routine del laboratorio. Dopo aver eseguito il test di Huber sono stati riscontrati valori anomali nella serie di misurazioni effettuate con il metodo TEMPO® TVC (tabella S1d ed S2d). Sulla serie di misurazioni effettuate con il metodo TEMPO® TVC inoltre, dopo aver effettuato il test di Shapiro-Wilks 5%, abbiamo riscontrato che non era verificata la normalità. I valori anomali sono stato rimossi ed è stata effettuata nuovamente la verifica della normalità al fine di garantire la conformità dei dati per il successivo calcolo dello scarto tipo di ripetibilità. Nelle restanti misurazioni non sono stati riscontrati valori anomali e la normalità era verificata per tutti i metodi. Il metodo TEMPO® STA per la categoria alimentare IV, in una prima fase dell'analisi, non ha fornito risultati accettabili. Non è stato possibile valutare la precisione perché in 8 repliche su 10 il risultato è stato inferiore a 10ufc/g (tabella 10)

Tabella 10: Risultati ottenuti con il metodo TEMPO® STA in due campioni naturali e nel campione contaminato artificialmente appartenenti alla categoria 4. I risultati sono riportati in UFC/g. I dati riportati nella colonna 3, sono quelli relativi al campione contaminato artificialmente e sono gli stessi riportati in tabella 1Sb. I valori del campione contaminato artificialmente sono riportati in UFC/ml in quanto la contaminazione è avvenuta dopo l'omogeneizzazione e quindi in fase liquida.

N replica	Campione N1 (ufc/g)	Campione N2 (ufc/g)	Campione A1 (ufc/ml)
1	<10	12	1,20E+04
2	<10	10	1,30E+04
3	10	<10	3,10E+04
4	<10	<10	2,10E+04
5	<10	<10	1,20E+04
6	<10	<10	3,00E+04
7	<10	15	1,20E+04
8	16	<10	2,10E+04
9	<10	<10	3,40E+04
10	<10	18	1,00E+04

Campione N1 ed N2: campioni naturalmente contaminati; Campione A1: campione contaminato artificialmente

La prova è stata ripetuta per ulteriori 10 misurazioni, prima utilizzando un secondo campione contaminato naturalmente proveniente dall'attività di routine del laboratorio, che però ha fornito nuovamente valori non accettabili (<10ufc/g) (tabella 10), poi utilizzando un

campione di partenza contaminato artificialmente. Quest'ultima analisi ha permesso di ottenere risultati validi per il calcolo della ripetibilità (tabella 10).

Al termine del calcolo della precisione abbiamo valutato le capacità tecniche dell'operatore coinvolto nella validazione secondaria della tecnica TEMPO®. Questo passaggio è stato necessario in quanto il calcolo dell'esattezza prevede il confronto tra i metodi ISO, il cui valore misurato è preso come standard di riferimento, e la tecnica TEMPO®, come riportato in materiali e metodi. Il primo parametro valutato è stata l'idoneità all'esecuzione dell'inoculo, mediante la verifica della ripetibilità dell'inoculo (Tabella 12a e b). Sono stati scelti preferenzialmente campioni appartenenti alle categorie I e IV. Le misurazioni sono state raccolte in maniera arbitraria e casuale nel corso del periodo Febbraio-Aprile 2013. I conteggi sono stati condotti in duplicato. Nella tabella 11a è possibile osservare che tutti i valori riportati sono accettabili. La somma dei valori di ripetibilità G^2_{n-1} risulta essere, per l'operatore coinvolto nella validazione, di 11,85, che è minore rispetto al χ^2 ricavato dalle rispettive tavole per $p=0,95$ e gradi di libertà $n-1=19$, che è pari a 30,193 (tabella 12b) Questo dimostra la capacità dell'operatore nell'eseguire l'inoculo. I terreni utilizzati, il relativo microrganismo analizzato e la norma ISO di riferimento sono riportati in Tabella 11.

Tabella 11: Terreni utilizzati, secondo la norma ISO di riferimento, per eseguire i test di verifica dell'operatore

TERRENO	MICROORGANISMO	ISO DI RIFERIMENTO
PCA	<i>Microrganismi a 30°C</i>	ISO 4833:2004
VRBA	<i>Coliformi totali</i>	ISO 4832:2006
VRBGA	<i>Enterobatteri</i>	ISO 21528-2:2004
TBX	<i>Escherichia coli</i>	ISO 16649-2:2001
BP	<i>Stafilococchi coagulasi positivi</i>	ISO 6888-1:2004

Tabella 12a: Valutazione ripetibilità dell'inoculo per l'operatore coinvolto nella validazione secondaria della tecnica TEMPO®

DATA	TERRENO	N° CAMPIONE	REPLICA1	REPLICA2	MEDIA	G_{n-1}^2	RIPETIBILITA'
FEBBRAIO	TBX	N4	20,00	22,00	2,10E+01	0,10	ACCETTABILE
FEBBRAIO	VRBGA	N5	80,00	87,00	8,35E+01	0,29	ACCETTABILE
FEBBRAIO	TBX	N6	20,00	27,00	2,35E+01	1,05	ACCETTABILE
FEBBRAIO	PCA	N7	250,00	230,00	2,40E+02	0,83	ACCETTABILE
FEBBRAIO	VRBA	N8	32,00	42,00	3,70E+01	1,36	ACCETTABILE
MARZO	VRBGA	N9	30,00	35,00	3,25E+01	0,38	ACCETTABILE
MARZO	VRBA	N10	40,00	45,00	4,25E+01	0,29	ACCETTABILE
MARZO	PCA	N11	170,00	200,00	1,85E+02	2,44	ACCETTABILE
MARZO	VRBA	N12	10,00	12,00	1,10E+01	0,18	ACCETTABILE
MARZO	PCA	N13	250,00	280,00	2,65E+02	1,70	ACCETTABILE
MARZO	VRBA	N14	17,00	21,00	1,90E+01	0,42	ACCETTABILE
MARZO	PCA	N15	110,00	100,00	1,05E+02	0,48	ACCETTABILE
MARZO	PCA	N16	290,00	270,00	2,80E+02	0,71	ACCETTABILE
MARZO	VRBA	N17	49,00	51,00	5,00E+01	0,04	ACCETTABILE
MARZO	BP	N18	20,00	21,00	2,05E+01	0,02	ACCETTABILE
APRILE	VRBA	N19	80,00	85,00	8,25E+01	0,15	ACCETTABILE
APRILE	PCA	N20	300,00	320,00	3,10E+02	0,65	ACCETTABILE
APRILE	BP	N21	12,00	15,00	1,35E+01	0,33	ACCETTABILE
APRILE	VRBGA	N22	65,00	71,00	6,80E+01	0,26	ACCETTABILE
APRILE	VRBGA	N23	27,00	30,00	2,85E+01	0,16	ACCETTABILE

G_{n-1}^2 = indice di dispersione sperimentale della ripetibilità dell'inoculo

Tabella 12b Indice di dispersione sperimentale della ripetibilità dell'inoculo totale

VALUTAZIONE RIPETIBILITA' TOTALE	
G TOTALE OPERATORE	11,85

Dopo aver calcolato e valutato la ripetibilità abbiamo valutato la proporzionalità dell'inoculo. Nella tabella 13a sono riportate le prove, prese in maniera randomizzata, nel periodo che va da marzo a aprile 2013. Per ogni campione sono state effettuate 2 diluizioni. La diluizione è valida in base al tipo di campione che abbiamo analizzato; normalmente quelle utilizzate per i patogeni sono la 1x (1:10) e la 2x (1:100), mentre per la carica microbica totale a 30°C le diluizioni normalmente utilizzate sono la 2X(1:100) e la 3x (1:1000). Nella tabella 13 per comodità abbiamo riportato la diluizione 1x come tale quale e quindi pari a 1, la diluizione 2x pari a 0,1 ed infine la 3x corrispondente a 0,01. I valori ottenuti con la conta di entrambe le diluizioni sono risultati tutti accettabili essendo il G^2 sper in tutti i casi inferiore al valore di χ^2 tabulato con probabilità $p=0,95$ e gradi di libertà $n-1=1$, pari a 3,841 (Tabella 13a). La somma dei valori di ripetibilità G^{sper} tot risulta essere, per l'operatore coinvolto nella validazione, di

7,85, che è minore rispetto a 16,919 corrispondente al χ^2 ricavato dalle rispettive tavole con $p=0,95$ (tabella 13b).

Tabella 13a. Valutazione proporzionalità dell'inoculo per l'operatore coinvolto nella validazione secondaria della tecnica TEMPO®

DATA	TERRENO	N°CAMPIONE	DILUIZIONE	VALORI	RAPPORTO DIL.	G ² sper.	PROPORZIONALITA'
FEBBRAIO	PCA	N24	1	171	0,1	0,065883	ACCETTABILE
			2	16	0,01		
FEBBRAIO	VRBGA	N25	1	30	1	3,395804	ACCETTABILE
			2	7	0,1		
FEBBRAIO	TBX	N26	1	102	1	0,27173	ACCETTABILE
			2	12	0,1		
FEBBRAIO	VRBA	N27	1	245	1	0,806805	ACCETTABILE
			2	20	0,1		
MARZO	BP	N28	1	152	1	1,1788	ACCETTABILE
			2	11	0,1		
MARZO	BP	N29	1	234	1	0,232582	ACCETTABILE
			2	21	0,1		
MARZO	TBX	N30	1	245	1	0,240988	ACCETTABILE
			2	22	0,1		
APRILE	VRBGA	N31	1	167	1	0,027089	ACCETTABILE
			2	16	0,1		
APRILE	PCA	N32	1	280	0,1	1,086478	ACCETTABILE
			2	34	0,01		
APRILE	VRBGA	N33	1	122	1	0,540409	ACCETTABILE
			2	15	0,1		

G²sper: indice di dispersione sperimentale della proporzionalità dell'inoculo

Tab.13b Indice di dispersione sperimentale della proporzionalità dell'inoculo totale

VALUTAZIONE RIPETIBILITA' TOTALE	
G TOTALE OPERATORE	7,85

L'ultimo parametro misurato per valutare la capacità dell'operatore è stata la ripetibilità nel conteggio. Per eseguire tale prova è stata calcolata la media quadratica degli scarti tipi relativi alle singole serie di conte. Sono state eseguite 10 prove consecutive suddividendo le prove in base al tipo di conteggio; 5 prove per i conteggi senza interpretazione delle colonie e 5 prove con terreni che prevedono l'interpretazione delle colonie (Tabella 14) Per ciascuna matrice presa in considerazione sono state valutate 2 repliche, delle quali è stata successivamente calcolata ed utilizzata la media. Nella tabella 14 è inoltre possibile osservare come l'unico microrganismo che non presenta interpretazione è la carica microbica totale, dove vengono

contate tutte le colonie in maniera indifferenziata. Per quanto riguarda invece stafilococchi coagulasi positivi, enterobatteri, coliformi totali ed *Escherichia coli* è necessaria prima di tutto un'interpretazione delle colonie così da capire quali sono effettivamente positive. Per le diverse prove non è stata riscontrata nessuna non conformità essendo tutte accettabili.

Tabella 14. risultati della valutazione della ripetibilità nel conteggio dell'operatore coinvolto nella validazione secondaria

Prova	N°campione	Terreno	Replica1	Replica2	Media	Varianza	S _r	U _i	U _i ²	Tipo di conteggio	Ripetibilità media totale	Ripetibilità
1	N34	PCA	200	198	199	2	1,414	0,007	0,0001	Senza interpretazione della conta	0,0188	accettabile
2	N35	PCA	170	175	172,5	12,5	3,536	0,020	0,0004			
3	N36	PCA	240	245	242,5	12,5	3,536	0,015	0,0002			
4	N37	PCA	155	149	152	18	4,243	0,028	0,0008			
5	N38	PCA	290	283	286,5	24,5	4,950	0,017	0,0003			
6	N39	VRBA	75	80	77,5	12,5	3,536	0,046	0,0021	Con interpretazione della conta	0,048544365	accettabile
7	N40	TBX	20	18	19	2	1,414	0,074	0,0055			
8	N41	VRBGA	87	91	89	8	2,828	0,032	0,0010			
9	N42	BP	51	48	49,5	4,5	2,121	0,043	0,0018			
10	N43	BP	76	80	78	8	2,828	0,036	0,0013			

S_r: scarto tipo di ripetibilità; U_i:scarto tipo relativo; U_i²: scarto tipo relativo quadratico

Per valutare in maniera opportuna l'accuratezza è necessario il calcolo dell'esattezza oltre che della precisione; l'esattezza è definita come il grado di accordo tra il valore medio ottenuto da una larga serie di risultati ed il valore di riferimento accettato.(Ballati 2004, ISO 16140:2003) Per il calcolo dell'esattezza abbiamo proceduto alla verifica della linearità e del grado di concordanza mediante l'analisi della correlazione e della regressione lineare tra i dati ottenuti con la tecnica tempo e quelli di riferimento ottenuti con la tecnica ISO. Il primo passaggio, la costruzione di grafici a dispersione, ci ha permesso di valutare in via preliminare la relazione tra i due parametri e scartare eventuali dati anomali. Per ogni categoria alimentare sono state analizzate due tipologie di matrice per organismo. Per la categoria II sono stati testati prodotti vegetali e preparazioni a base di carne, mentre per la categoria IV sono stati analizzati gli campioni di gastronomia e formaggi. In tutti i grafici si può osservare una chiara correlazione positiva tra i dati ottenuti con la tecnica ISO e quelli ottenuti con la tecnica TEMPO®. Il grafico 2Sa, corrispondente al conteggio dei Coliformi nella matrice Carote a fili, mostrano una dubbia correlazione tra le misurazioni effettuate con la TEMPO® e quelle effettuate con la ISO, mostrando un elevato grado di dispersione dei dati (figura S2). Il grafico 1Sb e il grafico 1Sc

corrispondenti ai dati ottenuti nella misurazione degli Stafilococchi e dei Coliformi rispettivamente, mostrano una leggera correlazione positiva, evidenziata da una discreta dispersione dei dati (figura S1). Successivamente alla verifica dei dati mediante la costruzione di grafici a dispersione è stato valutato il coefficiente di correlazione r . In tabella 15a e 15b sono riportati i risultati della determinazione del parametro r per ogni microrganismo. Il parametro r può assumere valori compresi tra -1 (correlazione negativa) e 1 (correlazione positiva) indicando assenza di correlazione in corrispondenza dello 0 (Casa 2003). Nelle misurazioni effettuate il parametro r tende a cadere all'interno del range 0,91-0,99, mostrando quindi una correlazione positiva tra i dati ottenuti con la tecnica TEMPO® e quelli ottenuti con la ISO (tabella 15a e b). In un solo test, quello relativo all'analisi dei Coliformi totali in campioni di verdure, è stato riscontrato un valore di correlazione pari a 0,4 (tabella 15a).

Tabella15a: Calcolo del coefficiente di correlazione tra i conteggi effettuati con la tecnica TEMPO® e la corrispondente ISO di riferimento per gli alimenti appartenenti alla Categoria II.

N	Microrganismo	Tipologia matrice	n campioni	r
1	<i>Escherichia coli</i>	Preparazioni a base di carne	10	0,99
2	<i>Escherichia coli</i>	Carote a fili	10	0,99
3	Microrganismi a 30°C	Preparazioni a base di carne	10	0,99
4	Microrganismi a 30°C	Carote a fili	10	0,98
5	Stafilococchi	Preparazioni a base di carne	10	0,99
6	Stafilococchi	Carote a fili	10	0,93
7	Coliformi	Preparazioni a base di carne	10	0,97
8	Coliformi	Carote a fili	10	0,43
9	Enterobatteri	Preparazioni a base di carne	10	0,97
10	Enterobatteri	Carote a fili	10	0,97

R: coefficiente di correlazione stimato;

Tabella15b: Calcolo del coefficiente di correlazione tra i conteggi effettuati con la tecnica TEMPO® e la corrispondente ISO di riferimento per gli alimenti appartenenti alla Categoria IV.

N	Microrganismo	Tipologia matrice	n campioni	r
1	<i>Escherichia coli</i>	Gastronomia	10	0,96
2	<i>Escherichia coli</i>	Formaggi	10	0,99
3	Microrganismi a 30°C	Gastronomia	10	0,99
4	Microrganismi a 30°C	Formaggi	9	0,97
5	Stafilococchi	Gastronomia	10	0,96
6	Stafilococchi	Formaggi	10	0,91
7	Coliformi	Gastronomia	10	0,91
8	Coliformi	Formaggi	10	0,97
9	Enterobatteri	Gastronomia	10	0,94
10	Enterobatteri	Formaggi	10	0,95

R: coefficiente di correlazione stimato;

La seconda parte della verifica dell'esattezza è stata il calcolo della regressione lineare. Dopo aver calcolato l'intervallo di fiducia per $p=0,95$ e aver calcolato il valore di significatività, o p-value, abbiamo effettuato il test delle ipotesi andando a verificare se era accettata l'ipotesi nulla ($H_0: b=0$), cioè la non correlazione tra i valori ottenuti con la tecnica TEMPO® e quelli misurati con la ISO, oppure l'ipotesi alternativa ($H_1: b \neq 0$), cioè l'esistenza di una correlazione lineare tra i risultati delle due tecniche (tabella 16a e 16b). Per tutti i test è stata verificata l'ipotesi alternativa con un livello di significatività (p-value) sempre inferiore a $1,25 \text{ E-}4$. Il test 8 della categoria II, relativo a misurazioni effettuate su campioni di vegetali per la ricerca dei coliformi totali, ha invece, con un livello di significatività superiore a $0,05$, confermato l'ipotesi nulla, dimostrando la possibile non correlazione tra i due metodi. In questo test infatti, come si può vedere dalla tabella 16a, è presente il valore 0 ($H_0: b=0$) all'interno dell'intervallo di confidenza per $\alpha=0,05$.

Tabella 16a: nella tabella sono riportati i risultati del test di ipotesi per la verifica della linearità tra la tecnica ISO di riferimento e il metodo TEMPO®, su matrici alimentari appartenenti alla categoria II. Per ogni microrganismo sono riportati il p-value e l'intervallo di fiducia per la verifica dell'ipotesi nulla. Se l'ipotesi nulla H_0 è rifiutata significa che c'è correlazione tra i dati.

N	Microrganismo	Tipologia matrice	n campioni	p-value	Inferiore 95%	Superiore 95%	$H_0=0$
1	<i>Escherichia coli</i>	Preparazioni a base di carne	10	1,68E-07	0,81	1,07	rifiuto
2	<i>Escherichia coli</i>	Carote a fili	10	1,38E-07	1,07	1,41	rifiuto
3	Microrganismi a 30°C	Preparazioni a base di carne	10	1,42E-08	0,85	1,04	rifiuto
4	Microrganismi a 30°C	Carote a fili	10	3,26E-07	0,88	1,19	rifiuto
5	Stafilococchi	Preparazioni a base di carne	10	1,68E-07	0,81	1,07	rifiuto
6	Stafilococchi	Carote a fili	10	1,25E-04	0,79	1,57	rifiuto
7	Coliformi	Preparazioni a base di carne	10	4,14E-06	0,70	1,07	rifiuto
8	Coliformi	Carote a fili	10	2,14E-01	-0,18	0,69	accetto
9	Enterobatteri	Preparazioni a base di carne	10	6,16E-06	0,77	1,20	rifiuto
10	Enterobatteri	Carote a fili	10	4,29E-06	0,82	1,26	rifiuto

Tabella 16b: nella tabella sono riportati i risultati del test di ipotesi per la verifica della linearità tra la tecnica ISO di riferimento e il metodo TEMPO®, su matrici alimentari appartenenti alla categoria IV. Per ogni microrganismo sono riportati il p-value e l'intervallo di fiducia per la verifica dell'ipotesi nulla. Se l'ipotesi nulla H_0 è rifiutata significa che c'è correlazione tra i dati.

N	Microrganismo	Tipologia matrice	n campioni	p-value	Inferiore 95%	Superiore 95%	$H_0=0$
1	<i>Escherichia coli</i>	Gastronomia	10	8,03E-06	0,70	1,12	rifiuto
2	<i>Escherichia coli</i>	Formaggi	10	4,48E-08	1,00	1,26	rifiuto
3	Microrganismi a 30°C	Gastronomia	10	6,20E-09	0,85	1,02	rifiuto
4	Microrganismi a 30°C	Formaggi	10	1,02E-05	0,81	1,25	rifiuto
5	Stafilococchi	Gastronomia	10	9,41E-06	0,83	1,33	rifiuto
6	Stafilococchi	Formaggi	10	2,51E-04	0,78	1,69	rifiuto
7	Coliformi	Gastronomia	10	2,16E-04	0,78	1,67	rifiuto
8	Coliformi	Formaggi	10	3,42E-06	0,66	1,00	rifiuto
9	Enterobatteri	Gastronomia	10	6,21E-05	0,63	1,18	rifiuto
10	Enterobatteri	Formaggi	10	3,46E-05	0,81	1,44	rifiuto

4 DISCUSSIONE

4.1 Parametro precisione

L'obiettivo del lavoro svolto in questo periodo di tirocinio, come riportato in precedenza, è stato ottenere l'accreditamento della tecnica TEMPO® mediante la sua validazione. Questo è stato possibile dimostrando all'organismo di accreditamento Accredia, mediante l'apporto di evidenze oggettive ottenute tramite un lavoro di validazione secondaria, che il laboratorio era in grado di utilizzare il metodo alternativo. I due parametri analizzati nel corso della validazione secondaria sono stati precisione ed esattezza. Primariamente abbiamo valutato la precisione cioè l'indice della dispersione della distribuzione della variabile normale a cui sono associati i risultati stessi, ed è stata calcolata come scarto tipo di ripetibilità (ISO16140:2003, Ballati 2004). Ai fini della determinazione del parametro precisione sono state effettuate 10 misurazioni sullo stesso campione per ciascun patogeno. Abbiamo effettuato dieci prove in quanto è il numero minimo richiesto ai fini della determinazione della precisione (ISO16140:2003). Le matrici alimentari sono state scelte in base all'utilizzo a cui sarà destinata la tecnica TEMPO® nel laboratorio. Nello specifico abbiamo analizzato alimenti appartenenti alle categorie alimentari II e IV. Avendo richiesto la validazione della tecnica TEMPO® per tali categorie, il laboratorio al termine della visita ispettiva sarà accreditato solamente per le tipologie di matrici alimentari che rientrano in queste stesse categorie. In tutte le serie di misurazioni è sempre stata effettuata una verifica dei dati mediante i test statistici Huber e Shapiro-wilks. Con il test di Huber abbiamo verificato la presenza di dati anomali che, se presenti, possono causare errori di valutazione nel calcolo della precisione (Ballati 2004). La presenza di misurazioni anomale può essere dovuta o ad una non corretta omogeneizzazione o a tempi di incubazione troppo lunghi, oltre il limite stabilito. Nel primo caso si può assistere a una distribuzione non omogenea dei microrganismi nel tampone tale per cui, successivamente, alcune schede risultano maggiormente contaminate rispetto ad altre. Nel secondo caso le colture possono svilupparsi di più rispetto agli altri campioni della serie. Durante le verifiche sono stati riscontrati dati anomali solamente nelle tabelle relative alla carica microbica totale, metodo TEMPO® TVC (tabella S1d ed S2d). Mantenendo il dato anomalo durante l'analisi statistica abbiamo ottenuto risultati diversi nelle due prove. Nel primo caso (tabella S1d), pur essendo presente il dato anomalo, il calcolo del rapporto tra lo scarto tipo di ripetibilità del metodo e quello misurato rientrava all'interno dei limiti di fiducia, portando ad accettare il parametro precisione. Nel secondo caso (tabella S2d) invece il calcolo del rapporto s_r/σ_r portava ad un

valore che non era compreso all'interno dell'intervallo di fiducia prestabilito e quindi la qualità dei risultati non era rispondente ai requisiti della validazione. Questo dimostra che il solo test di Huber non è sufficiente a verificare la bontà dei dati (UNICHIM 179/1 2011). Il secondo test applicato alle misurazioni è stata la verifica della normalità tramite le statistiche di Shapiro-wilk. Nelle serie di dati relative alle tabelle S1d e S2d il test ha riscontrato che non era rispettata la distribuzione normale. Rimuovendo i valori anomali da entrambi i casi, e ripetendo il test di Shapiro-wilk, abbiamo verificato che questa volta i dati rispettavano la distribuzione normale. Eseguendo nuovamente i calcoli per la determinazione della precisione è risultato che in entrambe le serie di misurazioni lo scarto tipo di ripetibilità calcolato rientra all'interno dei limiti di fiducia. Questo dimostra che non è sufficiente un solo test per verificare i dati ma la combinazione delle statistiche di Huber e Shapiro-wilk. Se non fosse stato applicato il test di Shapiro-wilk, nel secondo caso avremmo potuto erroneamente mantenere il dato anomalo. Così facendo avremmo potuto dimostrare che il laboratorio era in grado di utilizzare il metodo quando in realtà non era così perché la serie di misurazioni, non rispettando la normalità, non poteva essere usata ai fini del calcolo della precisione (UNICHIM 179/1 2011). Il calcolo dello scarto tipo di ripetibilità per gli altri metodi rientra all'interno dell'intervallo di fiducia. Nel caso in cui fossero state riscontrate delle non conformità, cioè il rapporto s_r/σ_r non fosse rientrato nell'intervallo di fiducia, sarebbe stato necessario riconsiderare il procedimento, fase per fase, ed apportare le appropriate azioni correttive, quali la ripetizione delle prove per diversi campioni con più aliquote in intervalli di tempo prestabiliti dal responsabile qualità del laboratorio. Se eventuali ripetizioni non avessero dato esito positivo allora probabilmente sarebbe stato necessario contattare la casa madre per capire le possibili problematiche a carico del sistema TEMPO®.

Concludendo possiamo affermare di aver dimostrato in maniera inequivocabile la precisione dei metodi sottoposti a validazione per entrambe le categorie e per tutti i tipi di microrganismi considerati: *Escherichia coli*, Coliformi totali, Microrganismi a 30°C, Stafilococchi coagulasi positivi ed Enterobatteri.

4.2 Operatori

La fase successiva è stata valutare le capacità tecniche dell'operatore coinvolto nella validazione secondaria. Abbiamo eseguito questo test in quanto il calcolo dell'esattezza prevede il confronto tra dati derivanti dalla tecnica TEMPO® e gli stessi misurati mediante tecnica ISO. La valutazione tecnica dell'operatore è stata necessaria in quanto il metodo ISO e

condotto per lo più in maniera manuale ed è quindi soggetta ad errori (Bellati 2004). Il primo parametro valutato è stata la ripetibilità dell'inoculo. Nella tabella 12a abbiamo riportato 20 misurazioni prese in maniera casuale tra febbraio ed aprile. Il periodo è stato scelto in modo da poter coprire un arco temporale sufficientemente lungo affinché la valutazione abbia significato (Ballati 2004, ISO 14461-1:2005, Lazzerini e Tinti 2012). I campioni sono stati scelti in modo tale che appartenessero alle categorie sotto studio (categoria II e IV). Per capire e valutare le competenze dell'operatore abbiamo dovuto analizzare ciascun campione in doppio, come specificato nel documento ISO 14461:2005. Dopo aver eseguito i calcoli per determinare l'indice di dispersione sperimentale G^2_{n-1} abbiamo riscontrato che tutte le misurazione effettuate sono risultate accettabili; La somma dei valori di ripetibilità G^2_{n-1} era pari a 11,85 e anch'essa, se confrontata con il valore χ^2 ricavato dalle tavole t di student, risulta accettabile.

Successivamente abbiamo valutato la proporzionalità dell'inoculo. Per il calcolo della proporzionalità sono stati presi a random 10 campioni nel periodo febbraio-aprile 2013. Anche in questo caso è stato scelto un arco di tempo sufficientemente lungo affinché la valutazione statistica avesse significato. Per ogni campione abbiamo eseguito 2 diluizioni sulle quali è stata calcolata la proporzionalità. Dai dati ottenuti abbiamo ricavato il fattore di ripetibilità G^2 sperimentale che è sempre risultato inferiore al valore di χ^2 tabulato con probabilità $p=0,95$ e gradi di libertà $n-1=1$. Successivamente abbiamo ricavato G^2 sperimentale totale; nel nostro caso il valore ottenuto è 7,85 che, confrontato con il valore del X^2 ricavato dalle tavole di Student, con $p=0,95$ ($X^2=16,919$), risulta essere minore e quindi accettabile. Non sono state riscontrate anomalie nelle fasi di verifica dell'inoculo. Ultimo parametro misurato è la ripetibilità nell'esecuzione del conteggio, che normalmente è una delle frasi più delicate per quanto riguarda la possibilità di commettere errori. Dai valori ottenuti con le repliche eseguite su 10 campioni, abbiamo calcolato la media quadratica degli scarti tipi relativi alle singole serie di conte. I campioni sono stati suddivisi in due gruppi: il primo ,per il quale non era necessaria l'interpretazione della colonia in fase di conteggio, in quanto le colonie sono state contate senza una selezione morfologica; il secondo invece è costituito da colonie che sono conteggiate in maniera selettiva. Infatti nel caso degli Enterobatteri(VRBGA), di *Escherichia coli*(TBX), dei Coliformi totali(VRBA) e degli Stafilococchi coagulasi positivi(BP) non tutte le colonie che si osservano sulle piastre sono contate, in quanto ciascun microrganismo presenta delle peculiarità uniche che ne permettono l'identificazione. Nello specifico gli Enterobatteri presentano colonie di colore porpora con o senza alone di

precipitazione, i coliformi, allo stesso modo, presentano colonie porpora con o senza alone di precipitazione, gli *Escherichia coli* sono rilevati per la caratteristica colorazione blu/verde ed in fine gli Stafilococchi coagulasi positivi che presentano colonie nere con alone opaco e trasparente (Lazzerini e Tinti 2012). Questa suddivisione è stata necessaria in quanto la possibilità di errore nelle due tipologie di terreno è diversa. Nel terreno in cui è necessaria la valutazione morfologica della colonia la probabilità di commettere errori è più elevata, questo per il fatto che è necessario discriminare tra colonie positive e negative. Dato che i valori che abbiamo ottenuto sono inferiori al valore di riferimento, entrambi gli scarti calcolati sono accettabili. Possiamo quindi affermare che i parametri di ripetibilità e proporzionalità dell'inoculo e di ripetibilità del conteggio sono rispettati e quindi l'operatore è idoneo all'esecuzione dei metodi ISO di riferimento utilizzati per il calcolo dell'esattezza.

4.3 Parametro esattezza

Il secondo parametro calcolato per eseguire la validazione secondaria della tecnica TEMPO® è l'esattezza che costituisce, insieme alla precisione, l'accuratezza parametro che permette di confermare le competenze del laboratorio nella fase di validazione ai fini dell'accreditamento del laboratorio per la tecnica alternativa TEMPO® (ISO 16140:2003). Nella prima fase abbiamo verificato la presenza di dati anomali mediante la costruzione di grafici a dispersione. Questo passaggio è stato necessario al fine di evitare errori di valutazione nel calcolo della regressione (ISO 16140:2003). I dati anomali sono stati osservati visivamente nel grafico cercando ed escludendo quei valori che si discostavano dalla linea di tendenza calcolata sull'insieme di valori. Dai grafici è stato possibile determinare il grado di correlazione tra i dati ottenuti con la ISO e quelli ottenuti con la TEMPO®. Questa verifica ci ha permesso di effettuare una valutazione a priori dei dati, permettendoci di escludere quelli che mostravano una mancanza di correlazione e linearità. Nel dettaglio il grafico 2Sa mostrava una dubbia correlazione tra le misurazioni effettuate con la TEMPO® e quelle effettuate con la ISO, ciò risulta visibile dall'elevato grado di dispersione dei dati. È infatti possibile notare che il valore di R^2 è pari a 0,1854. I grafici 1Sb e 1Sc mostrano invece una leggera correlazione positiva, evidenziata da una discreta dispersione dei dati, infatti i valori di correlazione calcolati dal grafico sono rispettivamente $R^2=0,8353$ e $R^2=0,8291$. La media dei coefficienti di correlazione calcolati sui dati delle altre prove è $R^2=0,94$. Attraverso i successivi calcoli della regressione lineare siamo riusciti a confermare quanto valutato con la costruzione dei grafici a dispersione, cioè che il grafico 2Sa, relativo ai coliformi in matrice vegetale, presenta valori non accettabili, a differenza dei grafici 1Sb e 1Sc che risultano

accettabili e quindi lineari. Dopo aver verificato che i dati riportati nel grafico 2Sa non rispondevano a quanto atteso, ed evidenziando quindi una non conformità, abbiamo programmato la ripetizione dell'analisi. Le nuove misurazioni sono state programmate sia sullo stesso campione sia su altri campioni di vegetali. Questa scelta è stata fatta per stabilire se il problema era dovuto al campione, al metodo oppure ad una casualità. Una delle ipotesi che sono state formulate a tal proposito è che la presenza di valori anomali in campioni di vegetali, nello specifico carote a fili, possa essere attribuita al rilascio nel mezzo di coltura di carotene da parte del vegetale. Il carotene disciolto, essendo un pigmento, può, in fase di lettura, aver interferito con l'assorbimento del colorante utilizzato dalla tecnologia TEMPO® provocando scostamento nei risultati. Le analisi per la valutazione della tecnica TEMPO® TC in campioni di vegetali sono ancora in corso. In seguito alla determinazione del coefficiente di correlazione r e dalla valutazione della linearità è risultato che in tutti i restanti campioni la tecnica TEMPO® fornisce lo stesso valore della tecnica ISO con un livello di probabilità $p=0,95$. Anche in questo caso, come spiegato precedentemente per la precisione, abbiamo dovuto contaminare artificialmente alcuni campioni, quelli in cui era difficilmente riscontrabile il germe target.

4.4 La visita ispettiva

La fase di accreditamento è fondamentale in quanto ci permette di garantire competenza nell'esecuzione delle analisi anche attraverso il metodo alternativo, e correttezza nel fornire i risultati (Accredia 2012).

La visita ispettiva da parte degli auditor Accredia è avvenuta a fine Aprile e si è svolta in due giornate. In questi due giorni si è cercato di capire se il laboratorio fosse in grado di svolgere le prove in maniera adeguata secondo le procedure di riferimento. Entrando nello specifico, la visita ispettiva ha messo alla prova la funzionalità e l'organizzazione del laboratorio nel suo complesso. Durante la prima giornata sono state valutate le procedure di campionamento effettuate dal personale qualificato. Successivamente è stata valutata l'esecuzione della procedura per la ricerca delle *Salmonella spp.* in campioni di carne secondo la ISO 6579:2002/COR.1:2004. È stata valutata l'esecuzione della prova e la documentazione interna che riporta la procedura operativa. Nello specifico si fa riferimento alla IOP-12 dove sono riportate in successione le fasi per l'analisi e le prove di conferma. In figura 10 è riportato lo schema a blocchi per l'esecuzione dell'analisi nella ricerca della *Salmonella spp.*

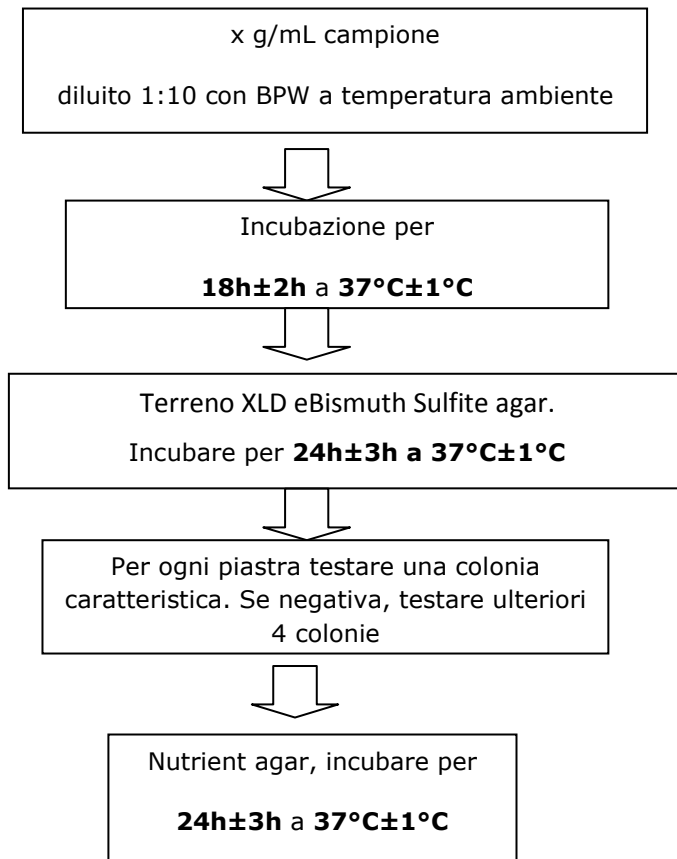


Figura10: Procedura richiesta per l'esecuzione del test su *Salmonella* spp. come riportato nel documento interno ai laboratori Fratini IOP-12

Gli auditor hanno richiesto inoltre una prova pratica nell'esecuzione della procedura relativa alla tecnica TEMPO®. Tale test è consistito nella ricerca degli Enterobatteri in matrice alimentare con metodo alternativo. Innanzitutto nella prova pratica abbiamo dovuto far attenzione ad una serie di parametri come: attenzione alla sterilità, ad una corretta idratazione dei terreni e alla definizione dell'intervallo di diluizione. E' stata controllata la data di scadenza delle card e dei terreni e la loro conservazione. Tutti i terreni utilizzati devono essere conservati al buio ad una temperatura di circa 25°C, questo non vale per il terreno degli Enterobatteri che devono essere conservati in frigo e al buio. Ciascun microrganismo presenta un'istruzione operativa di riferimento come da Tabella17.

Tabella 17: in tabella sono riportate il codice di riferimento della procedura operativa utilizzate nei laboratori Fratini per la tecnica TEMPO® e il relativo microrganismo ricercato

Microrganismi	Istruzioni Operative
Enterobatteri	<i>IOP-07</i>
Coliformi totali	<i>IOP-05</i>
Carica microbica totale a 30°C	<i>IOP-11</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>IOP-08</i>
Stafilococchi coagulasi positivi	<i>IOP-13</i>

La procedura che ci è stata richiesta è la stessa dal punto di vista pratico per tutti i patogeni, cambiano solo i terreni, le temperature di incubazione ed il tempo d'incubazione .(figura 11)

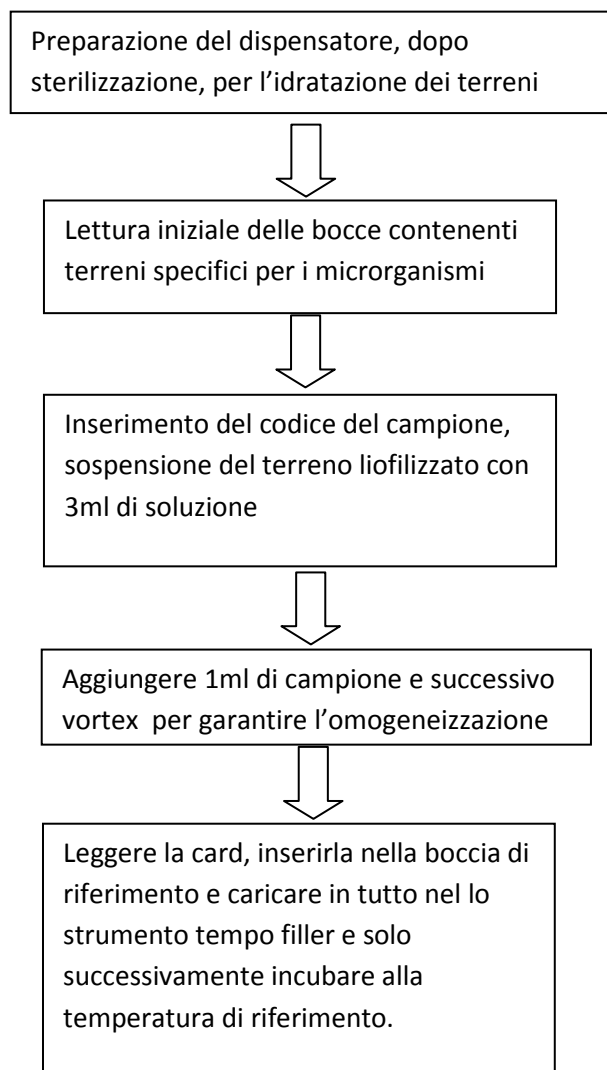


Figura 11: Procedura generale di analisi attraverso il metodo alternativo TEMPO®

Una volta dimostrata la competenza nella parte pratica, seguendo le procedure precedentemente riportate, sono state richieste una serie di documentazioni relative alle tarature degli strumenti utilizzati.

1. Autoclave-AP08
2. Bilancia tecnica-AP13
3. Termostato a 30°C-AP20
4. Termostato a 37°C-AP21
5. Termostato a 35°C-AP25
6. TEMPO® Filler-AP62
7. TEMPO® Reader-AP-63

Sono stati inoltre esibiti, in seguito a richiesta, i fogli Excel utilizzati per eseguire i calcoli necessari alla validazione della tecnica TEMPO®. Sono state richieste le analisi relative a: precisione, dati riportanti i valori dell'esattezza ed in fine i dati relativi alle competenze dell'operatore.

In figura 12 è rappresentato un esempio di foglio di calcolo utilizzato per il calcolo della precisione e per condurre i test di Huber e Shapiro-Wilks.

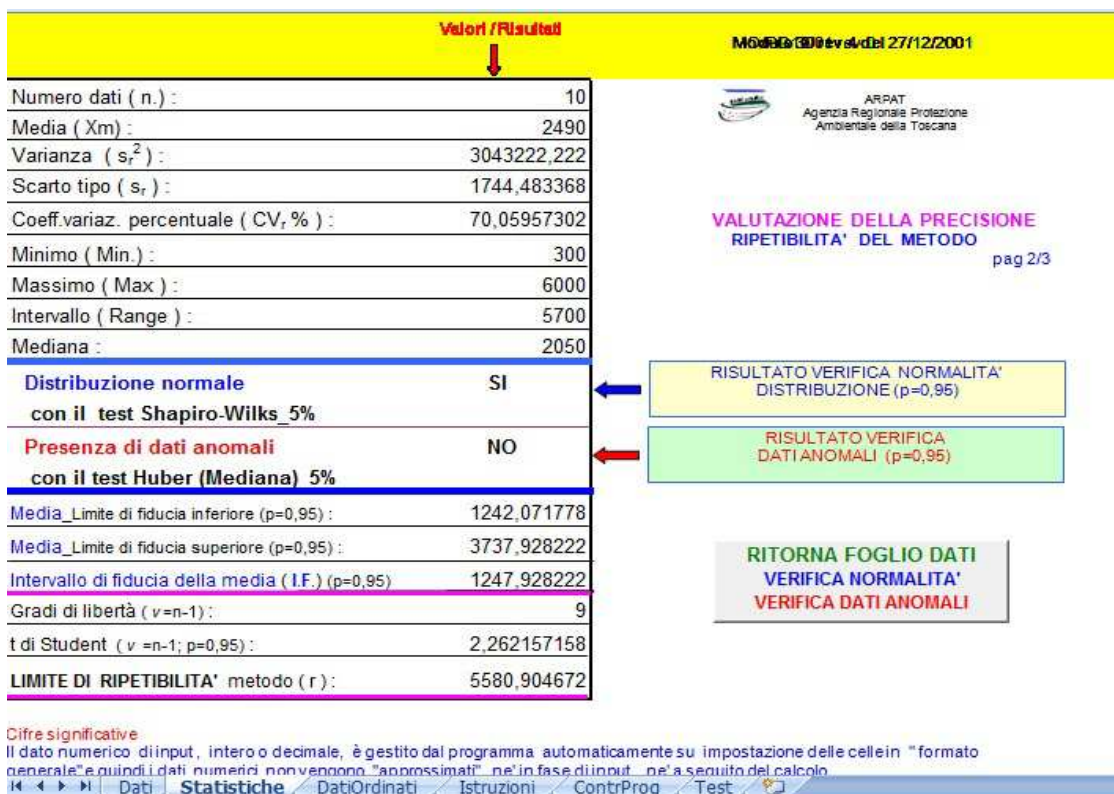


Figura12: Foglio di calcolo utilizzato per testare i dati secondo le statistiche di Huber e Shapiro-wilks e per calcolare lo scarto tipo di ripetibilità sperimentale.

Ultima richiesta formulataci è consistita nel prendere visione di un rapporto di prova. casuale tra quelli pre-esistenti che presentasse sia metodi ISO che TEMPO®. In figura 13 abbiamo riportato uno dei rapporti che abbiamo sottoposto ad Accredia. Innanzitutto è stato controllato il formato così da accertarsi se fossero riportati tutti i dati quali:

- Committente
- Località
- Data di campionamento
- Data di accettazione
- Data inizio/fine prove
- Luogo di campionamento
- Metodo di campionamento
- Parametro analitico e relativo metodo di analisi
- Unità di misura
- Limiti di legge se previsti
- Incertezza di misura
- Indicazione dei metodi non accreditati (Ad esempio i Lattobacilli: ISO 28128:2006)

La particolare attenzione al rapporto di prova è dovuta al fatto che quest'ultimo è il documento ufficiale che perviene al cliente. Uno dei fattori più importanti da controllare risulta essere l'apposizione del logo in base ai metodi accreditati. In questo caso il metodo dei lattobacilli non è accreditato quindi, come si vede nel rapporto di prova, deve essere indicato mediante l'utilizzo di un asterisco. L'importante è che il metodo non accreditato sia indicato in maniera inequivocabile (Accredia 2012).

Una volta accertata la conformità del rapporto di prova è stata richiesta la documentazione relativa all'incertezza di misura. Qui è stato dimostrato come l'incertezza sia fornita direttamente dalla macchina che considera l'intervallo di probabilità e il valore calcolato, permettendole quindi di fornire il limite di confidenza(Figura14)

Rapporto di Prova N° 3676/13 del 21/08/2013

Committente....: ██████████
Località.....: ██████████
Descr.Campione: carne cruda lavorata
Campionamento: esecuzione/indicazione dati del cliente
trasporto a cura di Laboratori Fratini
Modalità Campion.: -----

Data di campionamento 05/08/2013
Ora di campionamento 09:45

Data Accettazione 05/08/2013

Data inizio prove 05/08/2013

Data fine prove 19/08/2013

Luogo di campionamento:
██████████

Note:

PROVE EFFETTUATE E RELATIVI RISULTATI

	Valori	limite m / valore guida	limite M	incertezza di misura	Unità di misura	metodo seguito
- 1 - Noce di vitello - Carcassa 13518653						
<i>Clostridi solfito-riduttori</i>	<10	-	-	-	ufc/g	ISO 15213:2003
<i>E. coli β-glucuronidasi +</i>	1 100	-	-	570 - 2100	ufc/g	AFNOR BIO 12/13-02/05
<i>Enterobatteriacee</i>	1 300	-	-	720 - 2400	ufc/g	AFNOR BIO 12/21-12/05
<i>Lattobacilli</i>	900	-	-	-	ufc/g	ISO 28128:2006 *
<i>Listeria monocytogenes</i>	<10	-	-	-	ufc/g	UNI EN ISO 11290-2:2005
<i>Microrganismi a 30°C</i>	45.000	-	-	17000 - 120000	ufc/g	AFNOR BIO 12/15-09-05
<i>Salmonella spp.</i>	assente	-	-	-	in 25 g	AFNOR BIO 12/19-09/05
<i>Stafilococchi coagulasi positivi</i>	< 10	-	-	-	ufc/g	AFNOR BIO 12/28-04/10

Clostridi determinati a 37°C
Enterobatteriacee determinate a 37 °C
Listeria monocytogenes determinata a 37°C
Stafilococchi determinati a 37°C

IL RESPONSABILE DI LABORATORIO

Dott. Luigi Fratini

Vicenza, 23/09/2013
Pagina 1 di 1 : Rap.Prova N° 3676/13 del 21/08/2013
ID Documento:1309231320091603

L'eventuale asterisco indica una prova o fase di prova non accreditata ACCREDIA.

Incetezza: l'incetezza riportata nel presente documento è l'incetezza estesa ed è ottenuta moltiplicando l'incetezza tipo composta per un fattore di copertura k=2, che per una distribuzione normale porta ad un livello di confidenza approssimativamente del 95%

Il presente rapporto di prova non può essere riprodotto parzialmente salvo approvazione scritta del laboratorio. I risultati riportati nel presente documento si riferiscono esclusivamente al campione sottoposto a prova che, dopo l'emissione del presente documento e salvo diversi accordi con il committente, è eliminato. Il presente documento e le registrazioni delle prove vengono conservati per 5 anni, salvo diversi accordi con il committente.

LABORATORI FRATINI S.r.l. con socio unico
Viale della Pace, 236/P
36100 Vicenza
Tel: 0444.514590 - Fax: 0444.8531129

amministrazione@laboratorifratini.net
www.laboratorifratini.net
C.F. - P.IVA e Iscr. Reg. Imp. 03054120245
R.E.A. VI-295466 - Cap.Soc. i.v. €10.000,00

Soggetta a direzione e coordinamento di **ECO-CHEM GROUP S.p.A.**


www.ecochemgroup.it

Figura13: Esempio rapporto di prova



Tab1: Raw data used to fit the logistic regression.

MPN/g CFU/g	Positive tubes		Confidence limits		proba
	0.1	0.01 0.001	Low	High	
<1.0	0	0 0	--	--	--
1	0	0 1	0.14	7.1	3.32E-03
1	0	1 0	0.14	7.1	3.32E-02
1	1	0 0	0.15	7.3	3.41E-01
2	0	0 2	0.5	8	2.06E-05
2	0	1 1	0.5	8	4.42E-04
2	0	2 0	0.5	8.1	2.08E-03
2.1	1	0 1	0.52	8.2	4.66E-03

Figura 14 Limite di confidenza fornito direttamente dal sistema TEMPO®

L'accreditamento è un passaggio molto importante e complesso al termine del quale il laboratorio risulta idoneo nell'esecuzione delle prove per cui ha richiesto l'accreditamento. Inoltre risulta in grado di garantire competenza e soprattutto la tracciabilità delle analisi eseguite (Accredia 2012). In tal senso è stato necessario, durante la visita ispettiva, fornire dati relativamente alle scadenze e ai lotti, attestati riguardanti i corsi di aggiornamento, pianificare l'organizzazione del laboratorio, controllare la frequenza e la modalità delle procedure per la sanificazione e garantire una corretta modalità di accettazione dei campioni.

5 Conclusioni

Concludendo possiamo quindi affermare che il laboratorio è riuscito a dimostrare competenza nell'utilizzo della tecnica TEMPO®. Durante la visita ispettiva sono stati richiesti gli Enterobatteri e non i Coliformi totali come sarebbe potuto accadere. Questo è stato molto vantaggioso perché, come detto in precedenza, abbiamo riscontrato alcuni problemi con la numerazione dei coliformi attraverso la TEMPO®. Nonostante non sia stata richiesta la tecnica dei Coliformi totali il laboratorio si impegna, nonostante l'accreditamento ottenuto, a non utilizzare la procedura TEMPO® TC per le matrici vegetali fino a ulteriori test di conferma.

Alla fine della visita ispettiva è stato fatto un resoconto dagli auditor di riferimento secondo tre parametri: non conformità, osservazioni e commenti. Le non conformità sono rappresentate da evidenze che possono rendere un'analisi non valida e quindi, nel peggiore dei casi, giustificare la sospensione dell'accreditamento; le osservazioni rappresentano delle inadeguatezze da risolvere in breve tempo dalla data della visita ispettiva; infine i commenti rappresentano dei suggerimenti per il miglioramento del laboratorio dal punto di vista qualitativo. Durante la visita ispettiva non sono state rilevate non conformità, tra le osservazioni le più importanti riguardano la mancata pianificazione del personale ed il mancato aggiornamento delle schede del personale stesso; in fine, tra i commenti, ci è stato suggerito di dettagliare meglio le qualifiche. Nel complesso quindi la visita ispettiva è avvenuta con successo ed è stato accreditato il metodo alternativo di nuova introduzione; per quanto riguarda le osservazioni ed i commenti riportati è sufficiente che il laboratorio fornisca entro un paio di mesi una risposta riguardante le modalità con cui ritiene opportuno risolvere le imprecisioni trovate.

Il motivo per cui il laboratorio ha deciso di adottare tale tecnica risiede nel fatto che negli ultimi anni la richiesta di analisi è aumentata. Risulta quindi sempre più difficile riuscire a rispondere alle richieste in tempi brevi. Questo è dettato anche dal fatto che le procedure ISO standard hanno dei tempi lunghi di esecuzione dell'analisi. Per questo è stato adottato un metodo in grado di automatizzare e quindi velocizzare le analisi così da garantire una risposta a tutti i clienti nei tempi opportuni. In tal senso l'automazione del metodo TEMPO® è ciò di cui avevamo bisogno infatti non è più necessario preparare i terreni ogni giorno, dato che la tecnica è dotata di terreno liofilizzato, ma soprattutto il vantaggio principale è la riduzione nei tempi di conta delle colonie (Delamare et al. 2013, Previdi et al. 2006). Fino a poco tempo fa un operatore doveva contare ciascuna diluizione di ciascun campione per ciascun patogeno, adesso invece è sufficiente inserire la card nella macchina TEMPO® reader per ottenere una lettura di 20 campioni in qualche minuto. Oltre a questi aspetti la tecnica TEMPO® ci ha permesso di garantire maggior uniformità dei risultati dato che si tratta di un metodo automatico (Delamare et al. 2013). L'unico svantaggio forse è il costo piuttosto elevato dei terreni liofilizzati. Anche in questo caso considerando il fatto che abbiamo adottato tale tecnica prevedendo comunque un aumento nel numero di campioni, è facile considerare come la convenienza anche dal punto di vista economico sia comunque assicurata. Adesso che l'accreditamento è avvenuto, bisogna capire come tenere sotto controllo il metodo alternativo. In quest'ottica è opportuno chiarire che la visita ispettiva avvenuta ad Aprile 2013 non è fine a

se stessa. Gli ispettori Accredia, dopo aver eseguito questo primo controllo e provato quindi le competenze del laboratorio, torneranno per quattro anni una volta all'anno per assicurare la continuità degli standard qualitativi del laboratorio e la capacità nell'uso del metodo TEMPO®. Per garantire che le competenze siano mantenute nel tempo si fa riferimento ad una serie di documenti atti a tenere traccia delle tarature degli strumenti, delle capacità tecniche degli operatori ed infine del mantenimento della tecnica TEMPO®. La prova del mantenimento della correttezza della tecnica TEMPO® nel tempo fa riferimento alla formula qui riportata che prende in considerazione lo scarto tipo ricavato dall'esecuzione mensile di prove in doppio (Ballati 2004):

$$|x_1 - x_2| \leq \sqrt{2} * s_r * t_{p=1-\alpha; v=n-1}$$

5.1 Prospettive future

A questo punto che l'accreditamento è stato ottenuto, l'obiettivo principale, per le successive visite ispettive, sarà quello di ricalcolare i dati relativi all'analisi dei coliformi in matrici vegetali che hanno presentato valori poco lineari. Oltre a questo sarà nostra premura dimostrare il mantenimento delle competenze per le analisi di laboratorio e nello specifico dimostrare la correttezza della tecnica TEMPO® nel tempo (De Martin 2011). Gli obiettivi futuri saranno sicuramente la risoluzione delle osservazioni fatte da Accredia e il miglioramento continuo della qualità, in modo da rendere il laboratorio sempre più organizzato e competente. Naturalmente per poter perseguire tali obiettivi una delle aspettative del laboratorio è quella di essere sempre aperti alle nuove tecnologie, partecipando a corsi di aggiornamento in grado di fornire conoscenze nuove e maggiore competenza nella gestione del sistema qualità interno al laboratorio.

6 APPENDICE

Esempio di procedimento per l'analisi di matrici alimentari mediante la tecnica TEMPO®

Nel seguente esempio è riportato il procedimento utilizzato per la ricerca delle Enterobatteriacee in matrici alimentari mediante il metodo TEMPO® EB. Gli altri protocolli sono identici dal punto di vista operativo, cambiano solo i rapporti di diluizione, in particolare per il metodo TEMPO® TVC in cui il rapporto di diluizione è 1:400

Esecuzione del test

Esempio della preparazione di una diluizione 1:40 che permette una conta compresa tra 10 e 49 000 UFC/ml. La diluizione può essere modificata in funzione della contaminazione attesa.

1. Prelevare un flacone di terreno di coltura per ogni campione da analizzare e riportarlo a temperatura ambiente prima dell'uso.
2. Regolare a 3 ml il dispensatore contenete il diluente secondario e adescare la pompa eliminando i primi due volumi distribuiti.
3. Connettersi alla stazione di preparazione TEMPO®.
4. Seguendo le istruzioni dell'interfaccia utilizzatore della stazione di preparazione, identificare il campione da analizzare o inserendo manualmente con la tastiera l'identificativo, o utilizzando il lettore di codici a barre della stazione di preparazione.
5. Ricostituire il terreno di coltura distribuendo con il dispensatore 3 ml di diluente secondario in ogni flacone.
6. Dal compartimento filtrato della busta TEMPO® prelevare, con una pipetta sterile, 1 ml e trasferirlo in un flacone contenente il terreno di coltura ricostituito. Omogeneizzare con un agitatore tipo vortex per circa 3 secondi. I 4 ml di terreno inoculato ottenuti corrispondono ad una diluizione 1:40 del campione.
7. Prelevare per ogni flacone di terreno inoculato una card, **senza toccare** la parte terminale del tubicino di trasferimento. Verificare attentamente la concordanza dei codici (colori e sigle) tra le card ed i terreni inoculati.
8. Associare all'identificativo del campione in esame i codici a barre del terreno inoculato e della card corrispondente utilizzando il lettore di codici a barre della stazione di preparazione, seguendo le istruzioni dell'interfaccia utilizzatore della stazione di preparazione.

9. Inserire il flacone contenente il terreno inoculato su un rack di riempimento. Disporre la card di fronte al flacone, con il tubicino di trasferimento della card immerso nel flacone. Il rack accoglie fino a 6 flaconi + card e permette di riempire simultaneamente da 1 a 6 card TEMPO®.
10. Introdurre il rack nel TEMPO® Filler ed avviare il ciclo di riempimento. Il terreno inoculato viene aspirato completamente nella card. Dopo il riempimento delle card, il TEMPO® Filler taglia e sigilla i tubicini di trasferimento. Tutte queste operazioni sono eseguite automaticamente e durano 3 minuti. Il ciclo di riempimento è comune a tutti i parametri e permette il riempimento simultaneo di card associate a parametri differenti.
11. Estrarre il rack di riempimento dal TEMPO® Filler e verificare a vista che i flaconi siano vuoti. Togliere le card dal rack e trasferirle sui supporti di incubazione : inserire le card nelle posizioni previste, posizionando l'etichetta della card di fronte all'utilizzatore (dalla parte dell'impugnatura del rack). Raggruppare sullo stesso rack le card da incubare alla stessa temperatura. Ogni rack accoglie fino a 20 card. Inserire le card unicamente nelle posizioni previste.
12. Eliminare in un idoneo recipiente i flaconi ed i tubicini di trasferimento utilizzati.
13. Incubare le card per **22-27 ore** a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, per ottenere performance analoghe alla norma EN ISO 21528-2 (1).

Nota : La durata dell'incubazione del test è gestita dal software TEMPO® Read, che integra un intervallo di tempo teorico di 15 minuti tra la lettura del codice a barre della card e l'inizio dell'incubazione. Se l'intervallo di tempo reale è superiore a 15 minuti (senza eccedere mai le 2 ore), questo tempo supplementare deve essere aggiunto al tempo di incubazione residuo visualizzato dal software TEMPO® Read, per rispettare un tempo di incubazione reale (in termostato a $35 \pm 1^\circ\text{C}$) almeno superiore a 22 ore. Tuttavia la lettura dovrà essere assolutamente eseguita nell'intervallo di 22-27 ore autorizzato dal software.

Letture delle card al termine dell'incubazione

1. Connettersi alla stazione di lettura.
2. Introdurre il rack di incubazione che contiene le card da leggere nel lettore. Il lettore assicura per ogni card la lettura dei codici a barre e l'interpretazione dei risultati di

fluorescenza dei pozzetti. Associa automaticamente l'identificativo del campione con il tipo di test, la diluizione ed i risultati della conta.

3. Edit dei risultati : sullo schermo della stazione di lettura il numero di UFC (unità formanti colonie) per grammo o per millilitro di prodotto iniziale viene associato all'identificativo del campione, al parametro saggiato ed alla data dell'analisi.
4. L'interfaccia utilizzatore della stazione di lettura permette di stampare i risultati o di trasmetterli al sistema informatico del laboratorio. Permette anche la consultazione dello storico dei risultati ottenuti nei giorni precedenti.
5. Alla fine dell'analisi, togliere le card dal rack ed eliminarle in un idoneo recipiente.

Nota : Dopo l'inoculo, è possibile conservare TEMPO® EB a 2-8°C, per un massimo di 48 ore, prima di iniziare l'incubazione di 22-27 ore a 35°C ± 1°C. E' importante sottolineare che il risultato ottenuto riporterà una annotazione "La card è stata letta troppo tardi". L'utilizzatore può precisare nel riguardo dei commenti che le card sono state lette dopo averle tenute in frigorifero.

Risultati e interpretazione

Quando la lettura è terminata, i risultati vengono analizzati automaticamente dal sistema informatico che determina per ogni pozzetto se il risultato è positivo. Il numero di pozzetti positivi ottenuti, rapportato al volume dei pozzetti ed alla diluizione del campione, permette di ottenere, in base alle tabelle del metodo MPN (Numero Più Probabile), i risultati della conta del campione iniziale in UFC per grammo o per millilitro.

TABELLE SUPPLEMENTARI

Tabella S1. Conteggi effettuati su campioni alimentari appartenenti alla categoria IV ai fini della determinazione del parametro precisione. In ogni tabella sono riportate 10 misurazioni effettuate in replicato su un unico alimento.

a). Coliformi totali

N repliche	x_i	y_i (Log)	Huber
1	4,80E+02	2,68	SI
2	7,10E+02	2,85	SI
3	1,10E+03	3,04	SI
4	1,90E+03	3,28	SI
5	2,30E+03	3,36	SI
6	2,40E+03	3,38	SI
7	2,40E+03	3,38	SI
8	2,60E+03	3,41	SI
9	3,10E+03	3,49	SI
10	3,30E+03	3,52	SI

c) *Escherichia coli*

N repliche	x_i	y_i (Log)	Huber
1	3,30E+02	2,52	SI
2	4,00E+02	2,60	SI
3	4,10E+02	2,61	SI
4	8,10E+02	2,91	SI
5	9,30E+02	2,97	SI
6	1,20E+03	3,08	SI
7	1,70E+03	3,23	SI
8	2,10E+03	3,32	SI
9	3,10E+03	3,49	SI
10	3,70E+03	3,57	SI

e) Enterobatteri

N repliche	x_i	y_i (Log)	Huber
1	3,00E+02	2,48	SI
2	1,00E+03	3,00	SI
3	1,20E+03	3,08	SI
4	1,30E+03	3,11	SI
5	1,70E+03	3,23	SI
6	2,40E+03	3,38	SI
7	3,40E+03	3,53	SI
8	3,60E+03	3,56	SI
9	4,00E+03	3,60	SI
10	6,00E+03	3,78	SI

b). Stafilococchi coagulasi positivi

N repliche	x_i	y_i (Log)	Huber
1	1,20E+04	4,08	SI
2	1,30E+04	4,11	SI
3	3,10E+04	4,49	SI
4	2,10E+04	4,32	SI
5	1,20E+04	4,08	SI
6	3,00E+04	4,48	SI
7	1,20E+04	4,08	SI
8	2,10E+04	4,32	SI
9	3,40E+04	4,53	SI
10	1,00E+04	4,00	SI

d) Carica microbica totale a 30°C

N repliche	x_i	y_i (Log)	Huber
1	4,30E+06	6,63	SI
2	4,60E+06	6,66	SI
3	1,30E+07	7,11	SI
4	2,50E+07	7,40	SI
5	3,40E+07	7,53	SI
6	4,70E+07	7,67	SI
7	5,30E+07	7,72	SI
8	6,70E+07	7,83	SI
9	4,50E+07	7,65	SI
10	5,00E+08	8,70	NO

Tabella S2. Conteggi effettuati su campioni alimentari appartenenti alla categoria II ai fini della determinazione del parametro precisione. In ogni tabella sono riportate 10 misurazioni effettuate in replicato su un unico alimento.

a) Coliformi totali

N repliche	x_i	y_i (Log)	Huber
1	1,20E+04	4,08	SI
2	1,20E+04	4,08	SI
3	1,40E+04	4,15	SI
4	1,70E+04	4,23	SI
5	2,00E+04	4,30	SI
6	2,30E+04	4,36	SI
7	3,70E+04	4,57	SI
8	4,40E+04	4,64	SI
9	4,90E+04	4,69	SI
10	5,20E+04	4,72	SI

b) Stafilococchi coagulasi positivi

N repliche	x_i	y_i (Log)	Huber
1	5,20E+02	2,72	SI
2	2,10E+03	3,32	SI
3	2,20E+03	3,34	SI
4	2,40E+03	3,38	SI
5	3,40E+03	3,53	SI
6	3,90E+03	3,59	SI
7	4,10E+03	3,61	SI
8	5,30E+03	3,72	SI
9	2,50E+03	3,40	SI
10	4,00E+03	3,60	SI

c) *Escherichia coli*

N repliche	x_i	y_i (Log)	Huber
1	1,20E+03	3,08	SI
2	1,30E+03	3,11	SI
3	1,40E+03	3,15	SI
4	1,50E+03	3,18	SI
5	2,30E+03	3,36	SI
6	2,90E+03	3,46	SI
7	4,80E+02	2,68	SI
8	4,40E+02	2,64	SI
9	3,30E+03	3,52	SI
10	2,70E+03	3,43	SI

d) Carica microbica totale a 30°C

N repliche	x_i	y_i (Log)	Huber
1	9,90E+04	5,00	SI
2	1,00E+05	5,00	SI
3	3,30E+05	5,52	SI
4	4,00E+06	6,60	NO
5	7,30E+05	5,86	SI
6	9,30E+05	5,97	SI
7	1,00E+06	6,00	SI
8	1,00E+06	6,00	SI
9	1,40E+06	6,15	SI
10	4,50E+05	5,65	SI

e) Enterobatteri

N repliche	x_i	y_i (Log)	Huber
1	9,30E+02	2,97	SI
2	1,30E+03	3,11	SI
3	2,20E+03	3,34	SI
4	3,30E+03	3,52	SI
5	3,90E+03	3,59	SI
6	4,00E+03	3,60	SI
7	5,00E+03	3,70	SI
8	6,40E+03	3,81	SI
9	7,2E+03	3,86	SI
10	1,2E+04	4,08	SI

Tabella 3S.:Conteggi effettuati ai fini del calcolo dell'esattezza in campioni alimentari appartenenti alla categoria IV. Per ogni campione è riportato il conteggio effettuato con la tecnica ISO e con la tecnica TEMPO® e i rispettivi valori trasformati in logaritmo.

a) Stafilococchi coagulasi positivi in campioni di gastronomia

<i>N°campione</i>	<i>ISO</i>	<i>TEMPO</i>	<i>log ISO</i>	<i>log TEMPO</i>
N44	80	59	1,90	1,77
N45	160	120	2,20	2,08
N46	190	230	2,28	2,36
N47	90	110	1,95	2,04
N48	100	89	2,00	1,95
N49	100	120	2,00	2,08
N50	320	360	2,51	2,56
N51	300	360	2,48	2,56
N52	350	410	2,54	2,61
N53	60	71	1,78	1,85

b) Stafilococchi coagulasi positivi in campioni di formaggi

<i>N°campione</i>	<i>ISO</i>	<i>TEMPO</i>	<i>log ISO</i>	<i>log TEMPO</i>
N64	7900	7800	3,90	3,89
N65	9900	11000	3,99	4,04
N70	11000	11000	4,04	4,04
N71	14000	12000	4,15	4,08
N72	20000	30000	4,30	4,48
N73	10000	9100	4	3,96
N74	11000	17000	4,04	4,23
N75	15000	21000	4,18	4,32
N76	18000	21000	4,25	4,32
N77	22000	25000	4,34	4,40

c) Coliformi totali in campioni di gastronomia

<i>N°campione</i>	<i>ISO</i>	<i>TEMPO</i>	<i>log ISO</i>	<i>log TEMPO</i>
N44	110	73	2,04	1,86
N45	220	160	2,34	2,20
N46	450	390	2,65	2,59
N47	190	210	2,28	2,32
N50	280	190	2,45	2,28
N51	200	170	2,30	2,23
N55	230	220	2,36	2,34
N56	410	500	2,61	2,70
N60	220	260	2,34	2,41
N62	280	330	2,45	2,52

d) Coliformi totali in campioni di formaggi

N°campione	ISO	TEMPO	log ISO	log TEMPO
N65	200	710	2,30	2,85
N71	1400	3300	3,15	3,52
N72	1000	2300	3,00	3,36
N73	1200	2600	3,08	3,41
N74	1400	1900	3,15	3,28
N75	18000	17000	4,26	4,23
N76	38000	34000	4,58	4,53
N77	23000	37000	4,36	4,57
N78	490	480	2,69	2,68
N79	980	2400	2,99	3,38

e) Enterobatteri in campioni di gastronomia

N°campione	ISO	TEMPO	log ISO	log TEMPO
N50	180	210	2,26	2,32
N51	300	300	2,48	2,48
N52	180	160	2,26	2,20
N53	260	150	2,41	2,18
N55	290	250	2,46	2,40
N56	340	200	2,53	2,30
N57	510	390	2,71	2,59
N58	300	360	2,48	2,56
N60	310	360	2,49	2,56
N61	30	31	1,48	1,49

f) Enterobatteri in campioni di formaggi

N°campione	ISO	TEMPO	log ISO	log TEMPO
N64	470	300	2,67	2,48
N65	1600	1700	3,20	3,23
N66	1300	1000	3,11	3,00
N67	4600	3600	3,66	3,56
N68	1000	1200	3,00	3,08
N70	2600	3400	3,41	3,53
N71	1000	1300	3,00	3,11
N72	4600	6000	3,66	3,78
N75	1500	2400	3,18	3,38
N79	3100	4000	3,49	3,60

g) *Escherichia coli* in campioni di gastronomia

N°campione	ISO	TEMPO	log ISO	log TEMPO
N44	80	170	1,90	2,23
N45	80	260	1,90	2,41
N46	50	150	1,70	2,18
N47	110	190	2,04	2,28
N50	10	21	1,00	1,32
N51	10	33	1,00	1,52
N52	50	100	1,70	2,00
N54	30	71	1,48	1,85
N55	20	57	1,30	1,76
N56	30	89	1,48	1,95

h) *Escherichia coli* in campioni di formaggio

N°campione	ISO	TEMPO	log ISO	log TEMPO
N64	650	930	2,81	2,97
N66	680	1200	2,83	3,08
N67	1200	3700	3,08	3,57
N69	500	810	2,70	2,91
N70	800	2100	2,90	3,32
N71	1000	3100	3,00	3,49
N73	570	1700	2,76	3,23
N74	380	400	2,58	2,60
N75	90000	370000	4,95	5,57
N78	96000	300000	4,98	5,48

i) Carica microbica totale a 30°C in campioni di gastronomia

N°campione	ISO	TEMPO	log ISO	log TEMPO
N53	1,6E+07	11000000	7,20	7,04
N54	1,2E+08	150000000	8,08	8,18
N55	8E+07	67000000	7,90	7,83
N56	9,8E+07	55000000	7,99	7,74
N57	1,6E+07	11000000	7,20	7,04
N58	1,5E+07	17000000	7,18	7,23
N59	2,8E+07	19000000	7,45	7,28
N60	3,1E+07	18000000	7,49	7,26
N62	100000	210000	5,00	5,32
N63	160000	370000	5,20	5,57

j) Carica microbica totale a 30°C in campioni di formaggio

<i>N°campione</i>	<i>ISO</i>	<i>TEMPO</i>	<i>log ISO</i>	<i>log TEMPO</i>
N64	3,4E+07	47000000	7,53	7,67
N65	1,5E+07	13000000	7,18	7,11
N66	9600000	4600000	6,98	6,66
N67	2,4E+07	25000000	7,38	7,40
N68	900000	1100000	5,95	6,04
N70	3600000	4300000	6,56	6,63
N71	2,8E+07	34000000	7,45	7,53
N72	5E+07	67000000	7,70	7,83
N75	4,6E+07	53000000	7,66	7,72

Tabella 4S. Conteggi effettuati ai fini del calcolo dell'esattezza in campioni alimentari appartenenti alla categoria II. Per ogni campione è riportato il conteggio effettuato con la tecnica ISO e con la tecnica TEMPO® e i rispettivi valori trasformati in logaritmo.

a) Stafilococchi coagulasi positivi in campioni a base di carne

<i>N°campione</i>	<i>ISO</i>	<i>TEMPO</i>	<i>log ISO</i>	<i>log TEMPO</i>
N105	70	89	1,85	1,95
N106	30	33	1,48	1,52
N107	160	240	2,20	2,38
N108	40	21	1,60	1,32
N109	660	1.200	2,82	3,08
N110	4.800	11.000	3,68	4,04
N111	4200	17000	3,62	4,23
A2	3.000	4.000	3,48	3,60
A3	2.400	4.000	3,38	3,60
A4	5.700	7.800	3,76	3,89

a) Stafilococchi coagulasi positivi in campioni vegetali

<i>N°campione</i>	<i>ISO</i>	<i>TEMPO</i>	<i>log ISO</i>	<i>log TEMPO</i>
N80	490	520	2,69	2,72
N81	1500	2100	3,18	3,32
N82	2100	2200	3,32	3,34
N84	3200	3900	3,51	3,59
N86	2500	2400	3,40	3,38
N90	2200	3400	3,34	3,53
N96	3300	9100	3,52	3,96
N102	3900	4100	3,59	3,61
N103	4400	5300	3,64	3,72
N104	5000	11000	3,70	4,04

b) Coliformi totali in campioni a base di carne

<i>N°campione</i>	<i>ISO</i>	<i>TEMPO</i>	<i>log ISO</i>	<i>log TEMPO</i>
N110	16000	8200	4,20	3,91
A5	15000	29000	4,18	4,46
A6	220	300	2,34	2,48
A7	6000	4800	3,78	3,68
A8	800	950	2,90	2,98
A9	4200	5700	3,62	3,76
A10	170	400	2,23	2,60
A11	360	380	2,56	2,58
A12	2000	2700	3,30	3,43
A13	3500	4000	3,54	3,60

c) Coliformi totali in campioni vegetali

<i>N°campione</i>	<i>ISO</i>	<i>TEMPO</i>	<i>log ISO</i>	<i>log TEMPO</i>
N86	440000	170000	5,64	5,23
N87	160000	12000	5,20	4,08
N88	2000	17000	3,30	4,23
N89	2700	37000	3,43	4,57
N90	6500	49000	3,81	4,69
N91	46000	150000	4,66	5,18
N92	36000	150000	4,56	5,18
N94	24000	110000	4,38	5,04
N96	160000	170000	5,20	5,23
N97	28000	20000	4,45	4,30

d) Enterobatteri in campioni a base di carne

N°campione	ISO	TEMPO	log ISO	log TEMPO
N105	880	930	2,94	2,97
N108	5400	1700	3,73	3,23
N109	340000	370000	5,53	5,57
A14	16000	33000	4,20	4,52
A15	6100	6400	3,79	3,81
A16	240	220	2,38	2,34
A17	820	810	2,91	2,91
A18	640	1300	2,81	3,11
A19	1100	2200	3,04	3,34
A20	2900	4000	3,46	3,60

e) Enterobatteri in campioni vegetali

N°campione	ISO	TEMPO	log ISO	log TEMPO
N84	260	240	2,41	2,38
N85	6000	2300	3,78	3,36
N86	280	280	2,45	2,45
N87	7300	9000	3,86	3,95
N91	21000	30000	4,32	4,48
N92	45000	49000	4,65	4,69
N93	27000	37000	4,43	4,57
N94	110000	110000	5,04	5,04
N95	172000	170000	5,24	5,23
N96	15000	68000	4,18	4,83

f) *Escherichia coli* in campioni a base di carne

N°campione	ISO	TEMPO	log ISO	log TEMPO
N105	160	280	2,20	2,45
N108	390	640	2,59	2,81
N109	750	1400	2,88	3,15
N110	1100	2400	3,04	3,38
A21	1100	3700	3,04	3,57
A22	1700	2000	3,23	3,30
A23	1800	2900	3,26	3,46
A24	40	89	1,60	1,95
A25	30	71	1,48	1,85
A26	30	73	1,48	1,86

g) *Escherichia coli* in campioni vegetali

N°campione	ISO	TEMPO	log ISO	log TEMPO
N85	380	360	2,58	2,56
N87	900	1400	2,95	3,15
N97	910	1200	2,96	3,08
N98	1600	2300	3,20	3,36
N99	940	1300	2,97	3,11
N100	1400	4000	3,15	3,60
N101	900	1500	2,95	3,18
N102	1800	2900	3,26	3,46
N103	3800	4400	3,58	3,64
N 104	20	10	1,30	1,00

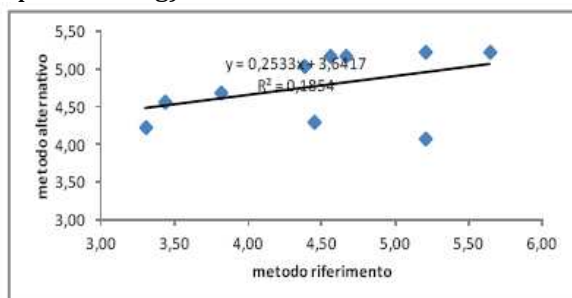
h) Carica microbica totale a 30°C in campioni a base di carne

N°campione	ISO	TEMPO	log ISO	log TEMPO
N105	560000	1200000	5,75	6,08
N106	31000	45000	4,49	4,65
N107	57000	73000	4,76	4,86
N108	270000	520000	5,43	5,72
N109	480000	1200000	5,68	6,08
N110	1800000	3100000	6,26	6,49
N111	1100000	2700000	6,04	6,43
N112	1700000	2400000	6,23	6,38
N113	820000	1700000	5,91	6,23
N114	1400000	1900000	6,15	6,28

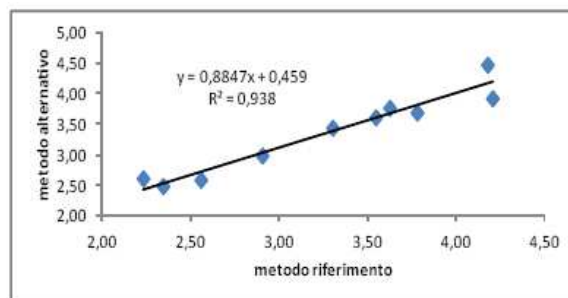
i) Carica microbica totale a 30°C in campioni vegetali

<i>N°campione</i>	<i>ISO</i>	<i>TEMPO</i>	<i>log ISO</i>	<i>log TEMPO</i>
N85	2,3E+08	370000000	8,36	8,57
N86	150000	99000	5,18	5,00
N87	98000	100000	4,99	5,00
N88	230000	330000	5,36	5,52
N89	740000	1000000	5,87	6,00
N90	1000000	450000	6,00	5,65
N91	990000	990000	6,00	6,00
N92	1100000	730000	6,04	5,86
N93	7600000	4400000	6,88	6,64
N95	820000	1000000	5,91	6,00

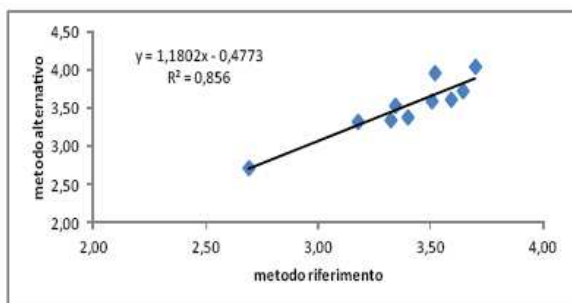
Figura S2. Grafici a dispersione con retta di regressione lineare. I campioni alimentari appartengono alla categoria II. Nell'asse x sono riportati i valori ottenuti dalla misurazione effettuata con la tecnica TEMPO® (espressi in log) mentre nell'asse y quelli ottenuti mediante la tecnica ISO di riferimento (espressi in log).



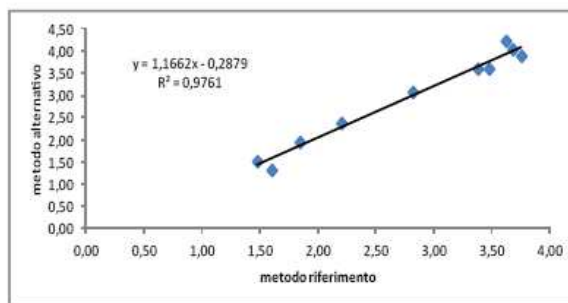
2Sa) Coliformi (vegetali)



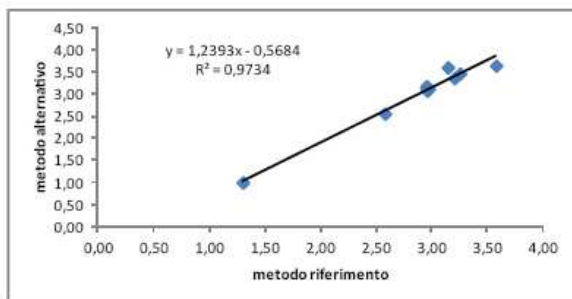
2Sb) Coliformi (preparati a base di carne)



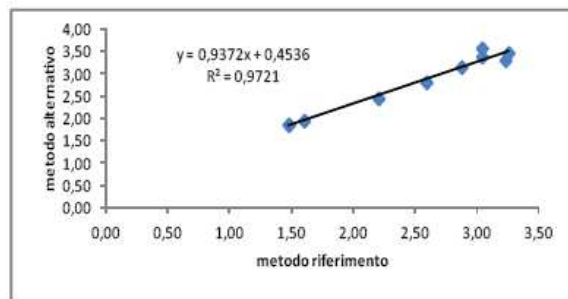
2Sc) Stafilococchi (Vegetali)



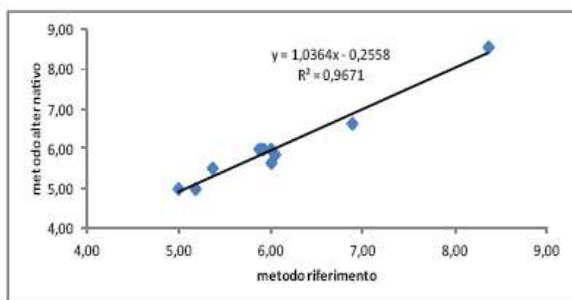
2Sd) Stafilococchi (preparati a base di carne)



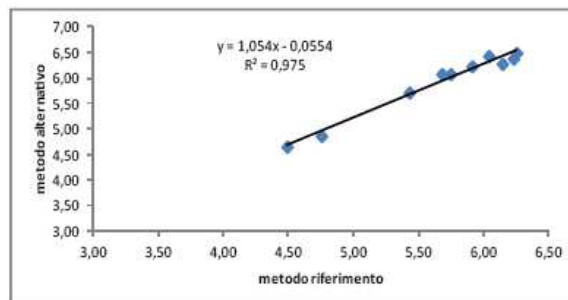
2Se) E. Coli (vegetali)



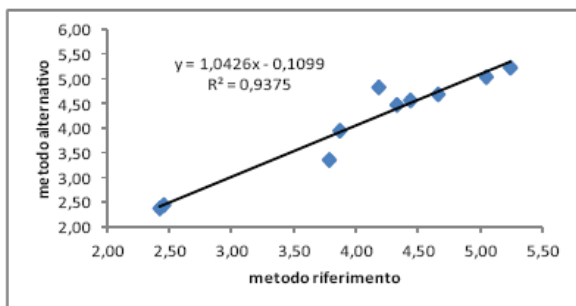
2Sf) E. Coli (preparati a base di carne)



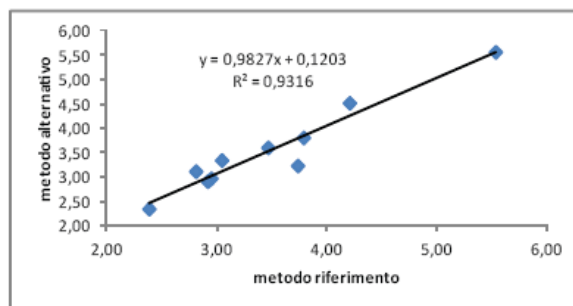
2Sg) Microrganismi a 30°C (Vegetali)



2Sh) Microrganismi a 30°C (preparati a base di carne)

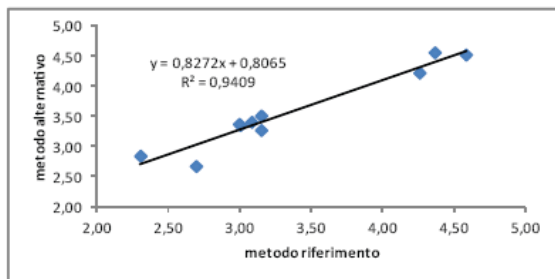


2Si) Enterobacteriacee (Vegetali)

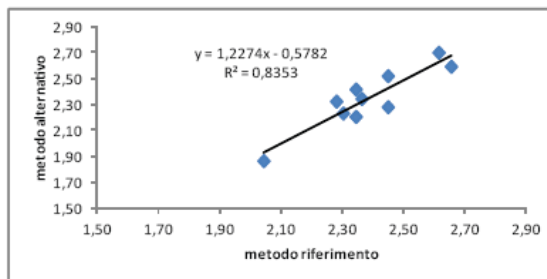


2Sj) Enterobacteriacee (preparati a base di carne)

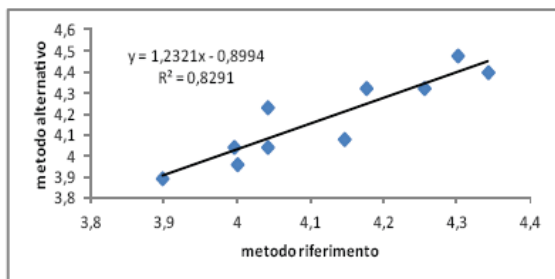
Figura S1. Grafici a dispersione con retta di regressione lineare. I campioni alimentari appartengono alla categoria IV. Nell'asse x sono riportati i valori ottenuti dalla misurazione effettuata con la tecnica TEMPO® (espressi in log) mentre nell'asse y quelli ottenuti mediante la tecnica ISO di riferimento (espressi in log).



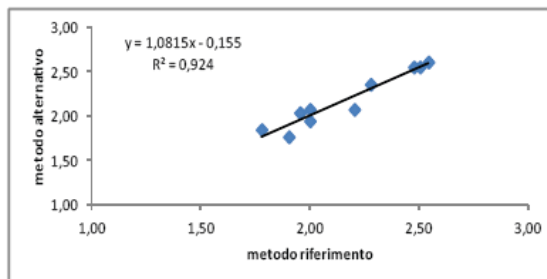
1Sa) Coliformi (formaggi)



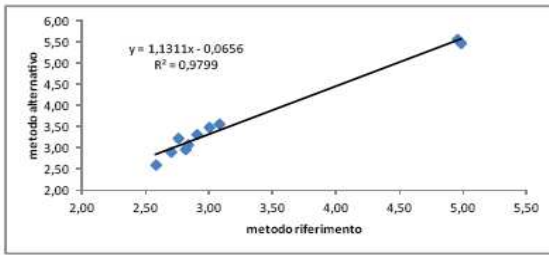
1Sb) Coliformi (gastronomia)



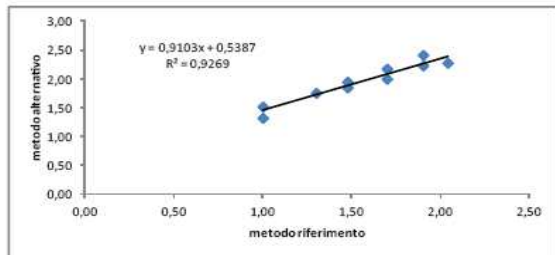
1Sc) Stafilococchi (formaggi)



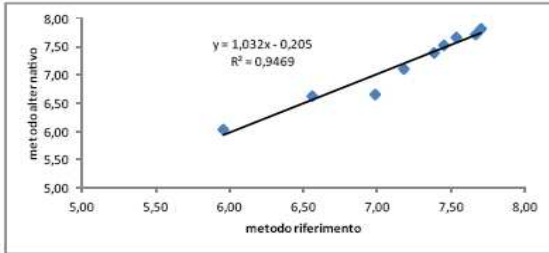
1Sd) Stafilococchi (gastronomia)



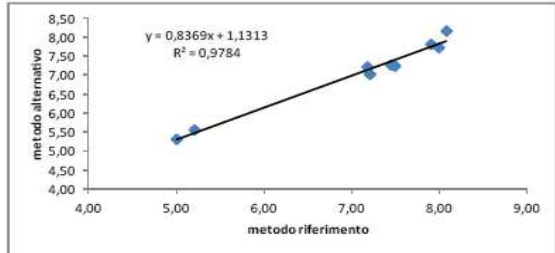
1Se) E. Coli (formaggi)



1Sf) E. Coli (gastronomia)



1Sg) Microrganismi a 30°C(formaggi)



1Sh) Microrganismi a 30°C (gastronomia)

6 BIBLIOGRAFIA

1. Accredia 2013. Accreditamento. <http://www.accredia.it>.
2. Accredia 2007. DT-0002/6: Guida al calcolo della ripetibilità di un metodo di prova ed alla sua verifica nel tempo. <http://www.accredia.it>.
3. Angela T. 2007. Igiene degli alimenti, p. 1-198. Milano, Hoepli.
4. Ballati L. 2004. La validazione dei metodi microbiologici: aspetti applicativi, controllo del processo analitico e valutazione dell'operatore. In Atti Documento Arpa Emilia Romagna, Giornata di formazione, Bologna, 25 novembre 2004, 1-28.
5. Beliaeff B. e Mary J.Y. 1993. The "most probable number" estimate and its confidence limits. *Water research*, 27(5), 799-805.
6. Calà P., Gallicchio S. e Luvisi M. 2013. Stato dell'arte e prospettive del sistema laboratoristico in materia di sicurezza alimentare. *Alimenti e bevande* 15 (5), 53-67.
7. Casa R. 2003. Relazioni tra variabili: Correlazione e regressione lineare. Dipartimento di Produzione Vegetale, Università degli studi di Roma1. <http://www.dis.uniroma1.it>.
8. Codega E. 2005. Valutazione performance dell'operatore. Documento ASL Lecco, Lecco ,15-16 Dicembre 2005.
9. Cochran W.G. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the " most probable number". *Biometrics*, 6(2), 105-116.
10. Delamare N., Dehon A. e Ilter C. 2013. Comparison of the new TEMPO® AC method with the ISO 4883 method for rapid enumeration of total aerobic count in food products. *Microbial Spoilers in food*, p 58.
11. De Man J.C.1983. MPN tables (corrected), *Eur. J. Appl. Biotechnol.*, 17, 301-5
12. De Martin S. 2011. Validazione, stima dell'incertezza e assicurazione del dato analitico alla luce dei regolamenti europei. In Atti Corso Accredia e Istituto Superiore di Sanità, Roma, 15-16 novembre 2011.
13. Frustoli M.A., Grisenti M.S., Lori D. e Barbuti S. 2005. Determination of *Listeria monocytogenes* in fresh pork meat. Validation of a rapid method. *Industria Conserve*, 80(3), 285-292.
14. Guzzo S., Palleschi G., Sibilla L., Bugatella S. e Spallucci V. 2010. La validazione secondaria in microbiologia degli alimenti. In Atti XII Congresso nazionale S.I.Di.L.V., Genova, 27-29 Ottobre 2010, 266-267.

15. ISO 4833:2004. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Metodo orizzontale per la conta di microrganismi - Tecnica della conta delle colonie a 30 °C
16. ISO 5725-1:2004. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions.
17. ISO 5725-2:2004. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.
18. UNI EN ISO 6888-1:2004. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Metodo orizzontale per la conta di stafilococchi coagulasi- positivi (Staphylococcus aureus e altre specie) - Tecnica che utilizza il terreno agar Baird-Parker
19. ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs–General requirements and guidance for microbiological examinations.
20. ISO 9001:2000. Quality management systems - Requirements.
21. ISO 13843:2001. Water quality - Guidance on validation of microbiological methods.
22. ISO 14461-1:2005. Milk and milk products -- Quality control in microbiological laboratories Analyst performance assessment for colony counts.
23. ISO 16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods.
24. ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli. Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
25. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
26. ISO19036:2006. Measurement uncertainty for low counts.
27. ISO 21528-2:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae -- Part 2: Colony-count method International Organization for Standardization, 2004.
28. Kawasaki S., Nazuka E., Bari M.L., Amano Y., Yoshida M. and Isshiki, K. (2003). Comparison of traditional culture method with DOX system for detecting coliform and Escherichia coli from vegetables. Food Science and Technology Research, 9(3), 304-308.
29. Laboratori Fratini 2012.PG-03 (rev 3) Gestione delle apparecchiature. Dati non pubblicati.

30. Laboratori Fratini 2010a. IOV-07 (rev 1) Campionamento alimenti. Dati non pubblicati.
31. Laboratori Fratini 2010c. IOV-04 (rev. 5) Sterilizzazione. Dati non pubblicati.
32. Laboratori Fratini 2010d. IOV-06 (rev. 7) Aree ed attrezzature. Dati non pubblicati.
33. Lazzerini A.R. e Tinti P 2012. Guida pratica per l'esecuzione di prove microbiologiche su alimenti e acque, Firenze: Arpat, 157-174.
34. Maiello A. 2006. Validazione e verifica delle prestazioni dei metodi microbiologici. In Atti Corso di aggiornamento laboratori accreditati, Milano, 14 settembre 2006.
35. Maiello A. 2008. ISO 7218:2007 e ISO/TS 19036 Un nuovo approccio di calcolo dell'incertezza di misura. In atti Corso di aggiornamento SINAL, Milano, 16 e 17 ottobre 2008.
36. Moca S. 2011. Accreditemento: valore aggiunto per i Laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. Webzine Sanità Pubblica Veterinaria: Numero 64, Febbraio 2011 [<http://spvet.it/>] ISSN 1592-1581, 17-20.
37. Owen M., Willis C. e Lamph D. 2010. Evaluation of the TEMPO® most probable number technique for the enumeration of Enterobacteriaceae in food and dairy products. *Journal of applied microbiology*, 109(5), 1810-1816.
38. Parente E. 2008. Criteri e standard microbiologici. <http://www2.unibas.it/parente/>
39. Pepa S. e Scognamiglio M. 2013. dall'incertezza alla certezza. Un passaggio necessario per la comparazione delle misure. <http://www.sinal.it>.
40. Previdi M.P., Franceschini B. e Gola S. 2006. TEMPO: automated system for total microbial count, total coliforms and *Escherichia coli* enumeration in meat products. *Industria Conserve*, 81(3), 243-250.
41. Ronzon F. 2005. Statistica applicata all'analisi microbiologica. Lecco, 15 Dicembre 2005-
42. Shapiro S.S., Bradbury W.M. 1965. "An analysis of variance test for normality (complete samples)", *Biometrika*, 52(3 e 4), 591-611.
43. SIT Italia. 2001. SIT/Tec-002/01: Linea guida per la taratura di misuratori di temperatura. <http://www.sit-italia.it/>
44. Spolaor D. 2011. Validazione, stima dell'incertezza e assicurazione del dato analitico nel settore della microbiologia degli alimenti in base alla 17025. In Atti Corso Accredia e Istituto Superiore di Sanità, 15-16 novembre 2011.

45. Torlak E., Akan I.M., Gökmen M. 2008. Comparison of TEMPO® EC and TBX medium for the enumeration of Escherichia coli in cheese. Letters in applied microbiology, 47(6), 566-570.
46. Tramontin S. 2009. Il ruolo delle certificazioni accreditate in un panorama legislativo in continua mutazione Il caso del settore agro-alimentare. <http://www.accredia.it>.
47. UNICHIM 179/1 2011. Valutazione della precisione (ripetibilità stretta) di un metodo analitico eseguito in un unico laboratorio da un solo operatore su di un unico strumento in un breve intervallo di tempo Edizione 2001.
48. Vargiolu T. 2012, Elementi di Probabilità e Statistica, p 153-176. Padova, CLEUP.
49. Viti A. 2005a. Validazione dei metodi microbiologici. In Atti workshop L'accreditamento dei laboratori per la sicurezza alimentare, 1-64, Roma, 25-26 Ottobre 2005.
50. Viti A. 2005b. Esempi pratici per la valutazione dell'incertezza di misura in ambito microbiologico. In Atti L'accreditamento dei laboratori per la sicurezza alimentare, 1-49, Roma, 25-26 Ottobre 2005.

SITOGRAFIA

www.accredia.it

www.sinal.it

www.wikipedia.org

www.ec.europa.eu

www.biomerieux.it

NORMATIVE

REGOLAMENTO (CE) N. 852/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari

REGOLAMENTO (CE) N. 853/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale

REGOLAMENTO (CE) N. 854/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano

REGOLAMENTO (CE) N. 882/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali

REGOLAMENTO (CE) N. 765/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 9 luglio 2008 che pone norme in materia di accreditamento e vigilanza del mercato per quanto riguarda la commercializzazione dei prodotti e che abroga il regolamento (CEE) n. 339/93

DIRETTIVA 2002/99/CE DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 2002 direttiva del Consiglio che stabilisce norme di polizia sanitaria per la produzione, la trasformazione, la distribuzione e l'introduzione di prodotti di origine animale destinati al consumo umano

REGOLAMENTO N. 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.

LIBRO BIANCO SULLA SICUREZZA ALIMENTARE - Bruxelles, 12.1.2000 COM (1999) 719

LIBRO VERDE SUI PRINCIPI GENERALI DELLA LEGISLAZIONE IN MATERIA ALIMENTARE - Bruxelles, aprile 1997 COM (1997) 176