

REPORT RISULTATI

PROVA INTERLABORATORIO “GIUGNO 2012” Carica Batterica Latte con Bactoscan FC

1- PREMESSA

Anche se per molti aspetti la presente prova ricalca le classiche prove interlaboratorio periodicamente realizzate nel corso degli anni , preme sottolineare fin da subito che il suo specifico scopo è significativamente diverso e di conseguenza diverso è l'approccio statistico applicato ai risultati.

La prova è infatti parte integrante del progetto di sviluppo della Conversione Unica che nel corso del 2012 ha coinvolto la maggior parte dei laboratori italiani utilizzatori dello strumento Bactoscan FC.

Per questo motivo, nel medesimo periodo in cui i singoli Laboratori eseguono le prove di confronto tra strumento e metodica di riferimento sul latte della propria area geografica, si è ritenuto utile eseguire un test di verifica dello stato di funzionamento degli strumenti .

Attraverso l'utilizzo di campioni di latte liofilizzato, previamente verificati per omogeneità di lotto ed idoneità al conteggio strumentale, si sono pertanto raccolti gli elementi oggettivi in grado di definire il “corretto funzionamento” degli strumenti utilizzati per la realizzazione del progetto di sviluppo della conversione . La valutazione si basa di conseguenza soltanto sulla misura della Riproducibilità dell'applicazione del Metodo di Prova rispetto a quella attesa .

2- Scopo della prova

Vengono valutate le performances strumentali in termini di ripetibilità e riproducibilità analitica attraverso l'analisi di n° 4 campioni di latte crudo liofilizzato, con la finalità principale di individuare strumenti con comportamento difforme dalle attese.

3- Modalità prove

33 laboratori hanno ricevuto ciascuno 4 campioni di latte liofilizzato con a diverso livello di IBC Bactoscan. Su ogni campione sono state richieste 2 repliche in modalità di ripetibilità. Un laboratorio inoltre ha partecipato alla prova con lo Strumento Bactocount Bentley a scopo di confronto e viene quindi considerato a se stante nell'elaborazione statistica dei dati .

4- Lista dei partecipanti (n° Lab. 34)

Ass. All. Friuli Venezia Giulia – Codroipo - Udine

Ass. Provinciale Potenza

Ass. Regionale Allevatori Lombardia - Crema

CHELAB SRL Resana (Treviso)

Ass. Regionale Allevatori Veneto – Padova

Centro Servizi per Agroalimentare – Parma

CASTALAB di Bussolati e Miti – Fidenza (PR)

Centrale del Latte di Roma SPA -

Ass. Regionale Allevatori Molise -

Centro Agrochimico Regionale A.S.S.A.M.- Jesi

IZS Lombardia Emilia Romagna - Sez. Diagnostica di Piacenza

IZS Piemonte Liguria e Val d'Aosta – Torino

ARTEST spa - Modena

IZS UMBRIA MARCHE - Perugia

Assegnatari Ass. Arborea (OR) -

SALCHIM - Cavriago (RE)

VENETO AGRICOLTURA - Thiene (VI)

CONCAST Trebntingrana - Trento

EPTANORD srl - Conselve (PD)

IZS Lazio e Toscana - Sez. Diagnostica di GROSSETO

MADE HSE srl - Gazzoldo I. (MN)

PARMALAT - Piana di Monteverna - Caserta
 IZS SICILIA - Sez. Diagnostica Ragusa
 IZS Lazio e Toscana - ROMA
 IZS SICILIA - Palermo
 GRANAROLO spa - Cadriano (BO)
 IZS Lazio e Toscana - Sez. Diagnostica Latina
 IZS Lombardia ed Emilia Romagna - Rep. Prod. Primaria Brescia
 IZS MEZZOGIORNO -Sez. Diagnostica Caserta
 IZS SARDEGNA - Lab. Latte Sassari
 Ass. Italiana Allevatori - Lab. Standard Latte -Roma
 Lab. Vailati srl - Brescia
 REG. Valle d'Aosta Prod. Veg. E Serv. Fitosanitari - Lab. latte - Aosta
 FEDERAZ. LATTERIE ALTO ADIGE - Bolzano A237+A237

5- Elaborazione dei dati

I dati sono stati trasformati in log₁₀ prima dell'elaborazione.

I valori target attesi per i due parametri di precisione (r ed R) sono stati definiti secondo le specifiche strumentali, in base a quanto dichiarato dal produttore dello strumento alla tabella sotto riportata:

Performance data

Repeatability:

Range (IBC/μl) Sr (log-units) Typical Sr (log units)

10 – 50	0.07	0.06
51-200	0.05	0.04
>200	0.04	0.02

Entire range 0.05

Reproducibility (between instruments):

Range (IBC/μl) SR (log-units) Typical SR (log units)

10 – 50	0.11	0.08
51 –200	0.07	0.06
>200	0.06	0.04

Fonte

(16/072012):

http://www.foss.dk/-/media/Files/Documents/IndustrySolution/BrochuresandDatasheet/BactoScanFC/BactoScan%20FC%20datasheet_GB.ashx

I due parametri della prova realizzata da valutare sono quindi gli scarti tipo di ripetibilità (Sr) e riproducibilità (SR) osservati che vengono posti a confronto con quelli attesi (rispettivamente 0.04 e 0.06, essendo tutti i 4 campioni ad un livello di IBC > di 200).

Allo scopo di evidenziare i risultati out-liers vengono applicati ai risultati osservati su ciascun campione, trasformati in log₁₀, due differenti test statistici :

- test di Chochran (ISO 5725-2:1994 PUNTO 7.3.3.) per la presenza di valori anomali in termini di variabilità interna alle repliche del laboratorio (ripetibilità)
- test di Grubbs (ISO 5725-2:1994 PUNTO 7.3.4.) per la presenza di valori anomali in termini di variabilità fra le medie di laboratorio (riproducibilità).

Vengono pertanto ricercati sui diversi livelli di "anomalia" :

- dato disperso (P<5% e P>1%)
- dato anomalo (P<1%).

I dati analitici appartenenti ad entrambe le categorie (che per definizione indicherebbero un differente livello di scostamento delle misure) sono stati comunque esclusi dalle successive elaborazioni, limitatamente al singolo campione in cui l'anomalia è stata osservata . I due test sono stati applicati nell'ordine sopra riportato e pertanto i risultati esclusi dal primo test non vengono valutati con il secondo .

6- Risultati

Il prospetto complessivo dei risultati grezzi forniti dai partecipanti e l'indicatore per singolo Lab. (media) sono riportati in Tabella 1. Si sottolinea che :

- Tutti i dati sono espressi in IBC/μL;
- Sono evidenziati i dati dispersi (*) o anomali (**) (vedi di seguito);
- Le medie in parentesi (), relative a repliche disperse o anomale non sono state prese in esame per la successiva elaborazione statistica ne per la stima del valore medio di singolo campione (ultima

riga) ; ciò riguarda in particolare i risultati del Lab AF *** che, come accennato , ha partecipato alla prova con uno strumento differente seppur di simile tecnologia;

- I laboratori sono ordinati in modo crescente per livello di media tot. (che comprende tutti i dati di ciascun laboratorio)

Tabella 1	campione A			campione B			campione C			campione D			MEDI A TOT.
Lab.	rep. A	rep. B	media	rep. A	rep. B	media	rep. A	rep. B	media	rep. A	rep. B	media	
AF ***	276	284	(280)	379	369	(374)	967	891	(929)	1208	1252	(1230)	(703)
Y	466**	378**	(422)	670	642	656	301	314	(308**)	2286	2247	2267	913
J	432	451	442	598	631	615	1192	1166	1179	1615	1576	1596	958
AG	442	425	434	581	603	592	1254	1195	1225	1603	1603	1603	963
I	452	425	439	623	644	634	1211	1274	1243	1665	1658	1662	994
P	447	432	440	637	582	610	1334	1310	1322	1740*	1524*	(1632)	1001
H	432	423	428	625	637	631	1286	1296	1291	1746	1730	1738	1022
A	432	441	437	598	609	604	1302	1310	1306	1857	1857	1857	1051
S	452	463	458	656	646	651	1318	1354	1336	1769	1788	1779	1056
U	438	390	414	574	649	612	1318	1381	1350	1939	1892	1916	1073
K	428	429	429	617	638	628	1483	1464	1474	1780	1784	1782	1078
Z	424	426	425	600	593	597	1412	1419	1416	1900	1874	1887	1081
AC	433	393	413	606	574	590	1410	1405	1408	1891	1959	1925	1084
L	440	445	443	628	630	629	1479	1416	1448	1888	1818	1853	1093
O	475	432	454	634	646	640	1398	1391	1395	1955	1935	1945	1108
M	439	430	435	648	670	659	1436	1400	1418	1924	1934	1929	1110
AE	425	421	423	592	608	600	1462	1430	1446	1989	1964	1977	1111
G	457	436	447	634	674	654	1419	1447	1433	2010	1957	1984	1129
N	438	426	432	605	638	622	1458	1471	1465	2098	1997	2048	1141
B	467	457	462	672	684	678	1503	1487	1495	1932	1930	1931	1142
X	447	452	450	649	678	664	1477	1468	1473	2021	2045	2033	1155
T	456	457	457	680	715	698	1518	1505	1512	1964	2014	1989	1164
AD	462	451	457	700	619	660	1513	1568	1541	2026	2034	2030	1172
AB	514	449	482	651	630	641	1575	1465	1520	2077	2119	2098	1185
AH	462	473	468	664	631	648	1575	1625	1600	2147*	1917*	(2032)	1187
D	452	444	448	678	679	679	1613	1577	1595	2112	2159	2136	1214
R	426	475	451	654	636	645	1584	1591	1588	2262	2253	2258	1235
E	473	480	477	685	717	701	1664	1573	1619	2203	2119	2161	1239
C	479	458	469	659*	551*	(605)	1721	1645	1683	2216	2257	2237	1248
F	480	473	477	688	698	693	1726	1700	1713	2192	2103	2148	1258
AA	472	477	475	674	701	688	1805	1718	1762	2502	2499	2501	1356
Q	491	457	474	706	741	724	1869	1871	1870	2464	2521	2493	1390
W	458	471	465	680	654	667	1852	1906	1879	2555	2609	2582	1398
V	488	494	491	717	N.D.	717	1793	1813	1803	2456	2441	2449	1457
MEDIA	449,5			647,5			1494			2025			

7- ELABORAZIONE STATISTICA

In considerazione della finalità della prova, la valutazione si limita a stimare gli indicatori di Ripetibilità e Riproducibilità analitica strumentale al fine di verificare il rispetto dei limiti attesi (target) . I risultati della stima sono sintetizzati in Tabella 2 .

Tabella 2					
CAMPIONE	A	B	C	D	target
MEDIA DI LIVELLO	2,652169	2,809705	3,1712056	3,3031793	
(media geometrica)	449	645	1483	2010	
numero di osservazioni	64	63	64	62	
Deviazione standard Ripetibilità:	0,0159	0,0152	0,0093	0,0066	0.04 (tipico: 0,02)
Deviazione standard Riproducibilità:	0,0226	0,0262	0,0523	0,0544	0.06 (tipico: 0,04)
GRSD(r)	3,7%	3,6%	2,2%	1,5%	
GRSD(R)	5,3%	6,2%	12,8%	13,4%	
GRSD(L)	3,8%	5,1%	12,6%	13,3%	
Ripetibilità relativa:	10,9%	10,4%	6,3%	4,4%	
Riproducibilità relativa:	15,9%	18,6%	40,6%	42,6%	
anomali test di Grubbs	AF**	AF**	Y** - AF*	AF*	** dato anomalo
anomali test di Cochran	Y**	C*		AH** - P**	* dato disperso

Da quanto esposto è possibile evidenziare che :

- Il Lab. Y presenta dati anomali per ripetibilità (Cochran) o riproducibilità (Grubbs) in due campioni su 4 analizzati . Inoltre presenta valori sistematicamente marginali rispetto al resto dei partecipanti
- I Lab P e AH presentano un unico dato anomalo sul medesimo campione (preventivamente giustificato, e segnalato, in quanto dipendente da un'impostazione strumentale relativa alla quantità di latte da prelevare) ;
- Il Lab. C presenta un unico esito disperso in uno dei campioni ;
- Il Lab. AF presenta dati anomali o dispersi su tutti i campioni analizzati in quanto determinati con strumento differente da tutti gli altri .

8- NOTA RELATIVA ALLA VALUTAZIONE SUL DISCRIMINANTE e BCS

Allo scopo di approfondire l'analisi delle osservazioni, ed in particolare ovviamente per una verifica relativa ai risultati anomali, si sono valutati i traccati di distribuzione degli Impulsi così come vengono prodotti dallo strumento ad ogni analisi ed i valori di lettura del "BCS" (Bacterial Control Sample, campione di controllo fornito dal Produttore dello strumento) che erano stati richiesti ai partecipanti .

- 4 dei Lab. partecipanti non hanno inviato i traccati grafici
- 3 dei Lab. non hanno comunicato il valore di lettura BCS
- 16 dei Lab. non hanno comunicato il V.M. "valore medio di lettura BCS" (peraltro non espressamente richiesto) .
- Tutti i Laboratori hanno comunicato il valore di Discriminante inserito nello strumento
- L'analisi dei traccati consente di evidenziare se, a livello di Discriminante, esistono situazioni particolari che condizionano ed in alcuni casi alterano il conteggio. Si tratta soltanto di uno dei possibili fattori strumentali condizionanti l'esito finale (oltre a veri e propri malfunzionamenti) ma è noto che , in particolari situazioni, esso può assumere un peso molto rilevante. Proprio sui campioni a titolo noto in seguito a trattamenti di conservazione, aggiunte o sottrazione di elementi , presenza di materiale estraneo derivante dai mezzi di contaminazione utilizzati, si possono infatti osservare significative interferenze del cosiddetto "rumore di fondo" sul conteggio degli impulsi.
- D'altra parte, il valore di lettura e, soprattutto, il V.M. del BCS costituiscono un controllo pre-analitico previsto dal Produttore che permette di evidenziare condizioni non ottimali di funzionamento e determina la necessità di ulteriori controlli o interventi correttivi .

Dall'analisi dei dati disponibili è emerso che :

- Il valore del Discriminante è risultato identico in tutti i Bactoscan utilizzati (nel modello FC il valore è preimpostato e la sua modifica è riservata a situazioni particolari di utilizzo) ;

- Il valore di Impulsi osservato nel BCS rappresenta un indicatore poco significativo sia per gli ampi limiti di tolleranza rispetto al valore medio di riferimento (differente da lotto a lotto) sia per la composizione “speciale” del prodotto; in ogni caso in Tabella 3 viene fornito un valore indicativo dello scarto percentuale tra il valore BCS dichiarato dal Lab. e quello di riferimento del lotto utilizzato dal quale si può dedurre che nella maggioranza dei casi lo scarto risulta contenuto attorno al 5% con rari casi sopra il 10% (si sottolinea inoltre che si tratta di misurazioni puntuali allegate al conteggio dei campioni in prova e non di vere e proprie valutazioni di controllo preventivo dello strumento per il quale si dovrebbero valutare letture replicate) .
- Più significativa è la valutazione del V.M. osservato sul BCS ; tal indicatore infatti deve rientrare in un intervallo molto ristretto essendo derivato dalle caratteristiche di intensità media di Impulsi sull'intero tracciato grafico (elemento indicatore di corretta “messa a fuoco strumentale”). In Tabella 3 vengono sintetizzati gli scarti osservati rispetto al valore di riferimento del singolo lotto. Malgrado il ridotto numero di dati disponibili, gli scarti appaiono estremamente contenuti , con l'eccezione di due casi (differenza 4) che non corrispondono a Lab. con risultati anomali .

NOTA : la difformità di lotti in uso presso i singoli Lab. e il riferimento unico di lettura non consentono di sviluppare ulteriormente l'analisi dei dati anche se , la sostanziale costanza del livello di Impulsi determinato da questo prodotto anche in lotti differenti , potrebbe rappresentare in futuro un elemento di riferimento per confronti intellaboratorio.

Sigla LAB.	Lotto BCS	diff % val rif. BCS (*)	Diff. Val. medio (**)
E	6003189	-3,99%	nd
M		-6,04%	nd
V		-5,44%	-1
Z		-5,84%	nd
AB		-4,89%	nd
AE	6003180	-8,28%	3
A		-7,46%	4
B		-5,44%	-4
N		nd	3
W		-4,57%	3
AH	6003177	-6,35%	3
D		-11,58%	nd
P		-12,14%	nd
T		1,31%	nd
AA		-5,09%	1
I	6003051	1,75%	nd
O		2,53%	nd
S		nd	-3
X		-8,72%	nd
J	6002881	-5,75%	-1
Q		-2,00%	nd
H	6003079	-8,45%	0
L		-8,60%	-3
Y	6003123	-8,14%	nd
AD		-7,04%	nd
F	6003154	-6,80%	nd
AG		-6,71%	-3
C	6003195	-5,54%	1
AC		-11,93%	-1
R	6002842	-0,14%	0
K	6002862	-10,19%	-3
U	6003200	-10,70%	1
G	nd	nd	nd
AF	nd	nd	nd

(*) = (Val BCS lab- Val. BCS Lotto)/ Val. BCS Lotto - (**) = Val Mean Lab- Val Mean Lotto

- L'analisi dei tracciati grafici infine, pur non potendo basarsi su elementi oggettivi e misurabili, risulta esemplificativa dell'origine degli Impulsi e, come accennato, in particolare dell'interferenza di "rumore di fondo". L'osservazione dei grafici (vedi i due esempi nelle figure seguenti) permette di evidenziare che per i campioni C e D, in molti Laboratori, il livello di Impulsi nell'area limitrofa al Discriminante appare consistente in quanto corrispondeva al picco di segnale, mentre in genere sui campioni A e B la medesima area, corrispondeva alla zona di minimo segnale. Fatte le debite proporzioni sia per la scala grafica che per l'incidenza percentuale degli impulsi sul risultato finale, è evidente che piccole variazioni di lettura (dato per fisso il Livello di Discriminante) possono incidere molto di più sui campioni del tipo C e D che su quelli A e B.

Nota : non è questa la sede per approfondire l'argomento , ma è doveroso ricordare l'esistenza di una netta differenza concettuale tra i campioni a titolo noto in coltura pura e quelli in coltura mista , così come l'importanza dell'utilizzo della matrice latte rispetto a matrici "artificiale" . A seconda della finalità per cui vengono utilizzati i campioni di controllo, questi due elementi sono infatti determinanti nel definirne l'idoneità. La presenza del rumore di fondo è infatti tipica di qualunque campione di latte (campioni da testare o campioni di controllo) e la definizione del Discriminante ha , appunto , il significato di definire un livello fisso di soglia per la "significatività" degli Impulsi . Con campioni in coltura batterica pura "monospecie" è possibile evitare o ridurre al minimo l'influenza del rumore di fondo sul conteggio . Anche campioni realizzati in matrici artificiali possono ridurre o eliminare il rumore di fondo . I campioni sottoposti ad analisi invece sono sempre e soltanto costituiti da coltura mista e matrice latte .

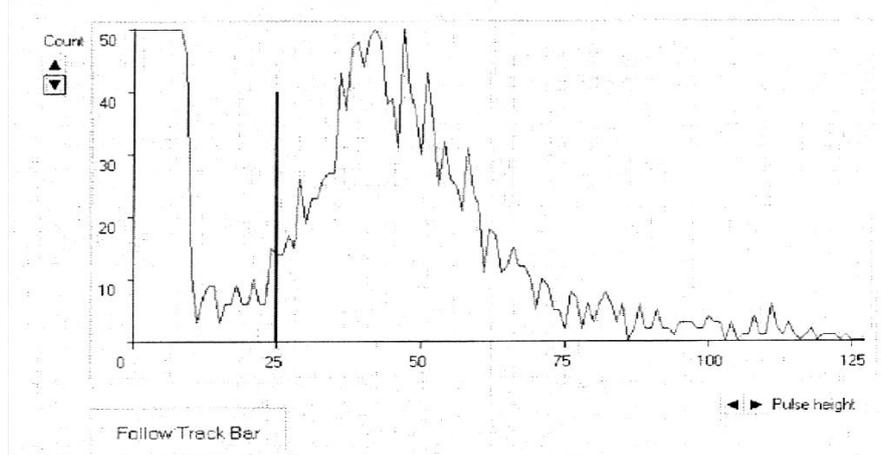


FIGURA 1 – Tracciato Campione A

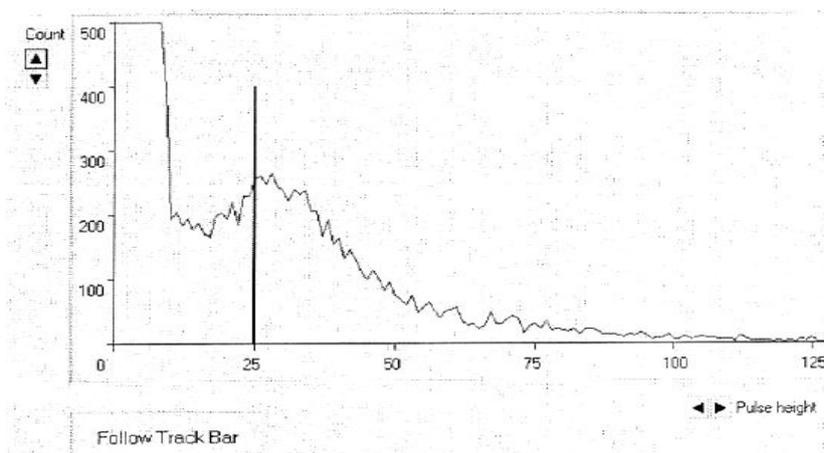


FIGURA 2 – Tracciato campione D

NOTA : Lo strumento utilizzato dal Lab. AF, fornisce indicazioni grafiche e di caratterizzazione della lettura più complesse e apparentemente più elaborate per le quali però non si ha la competenza sufficiente per interpretazioni affidabili. Dalla rappresentazione grafica sembrerebbe, quale ipotesi assolutamente indicativa, che la parte di Impulsi sottosoglia sia molto ampia e ciò, in linea di massima , potrebbe giustificare i conteggi significativamente sottostimati rispetto al Bactoscan. Ciò ha significato dal punto di vista della prova , ma non deve assolutamente essere traslato al normale utilizzo dello strumento su campioni di latte "normali" . I campioni di latte liofilizzato utilizzati nella presente prova sono del resto stati progettati, prodotti e controllati specificatamente per lo strumento Bactoscan e non

sono quindi necessariamente idonei ad altre strumentazioni . Da precedenti esperienze personali , realizzate su campioni di latte di stalla, del resto le differenze di conteggio tra i due sturmenti erano apparse significativamente inferiori.

NOTA : I risultati del Lab. Y relativamente ai due campioni risultati anomali ed alla sistematica sottostima su tutti i campioni, in assenza di analisi sui grafici e del valore medio BCS non comunicati, consigliano un approfondimento sulle condizioni operative dello strumento nel giorno della prova anche in considerazione della successiva valutazione sui risultati delle prove di confronto tra strumento e metodo di riferimento .

9- Considerazioni specifiche sulla prova

Pur non essendo obbiettivo specifico della presente prova, si ritiene opportuno soffermarsi brevemente sulla valutazione della dispersione delle osservazioni complessive la cui sintesi è presentata in Tabella 4 .

Tabella 4 – Esito complessivo della prova				
	Campione A	Campione B	Campione C	Campione D
				2025
MEDIA	449,5	647,5	1494	
				1984
MEDIANA	448,8	646,3	1469	
				256,2
DEV.ST	20,32	36,62	181	
C.V.%	4,5%	5,7%	12,1%	12,6%

- La dispersione (Dev.St e C.V.%) fra medie di Lab (comparabile in termini concettuali con il valore di GRSD(L) stimato dai dati normalizzati logaritmicamente), appare particolarmente elevata per i campioni C e D . Si sottolinea che assumendo i valori target di Sr ed SR sopra indicati, la dispersione fra medie di laboratorio dovrebbe collocarsi al di sotto dell'11% ;
- A questo proposito appare corretto aggiungere che nella stima eseguita al Punto 7 del presente documento, le performances fornite dai singoli Lab rispetto ai limiti di variabilità attesi , erano determinate contemporaneamente da Ripetibilità e Riproducibilità analitica del singolo Lab per singoli campioni . Evidentemente, questi due fattori interagiscono e pertanto ottime performances di ripetibilità (abbastanza frequenti con questo tipo di strumentazione), possono compensare nella stima della Riproducibilità complessiva , differenze sistematiche tra Laboratori .
In questo tipo di considerazione invece, la valutazione forse più "tradizionale" della singola prova a se stante, evidenzia in modo più diretto il rapporto tra i sigoli Lab (dispersione) , ma risulta fortemente condizionata dal tipo e dal numero di campioni utilizzati, dal numero di laboratori e dalla modalità di definizione del "valore vero" dei campioni e così via. Quanto sopra quindi avrebbe rilevanza unicamente per le condizioni specifiche della presente prova , ma non determina considerazioni generali sullo strumento o sul metodo .
- Di conseguenza considerando quanto sopra, oltre alla finalità della prova, non si ritiene necessario, procedere ad una stima puntuale di statistiche di classificazione o punteggio (Z-score) .

10- CONCLUSIONI

I risultati complessivi della prova confermano che gli strumenti attualmente utilizzati per la realizzazione del progetto di sviluppo della Conversione Unica forniscono performances che rientrano nei limiti di ripetibilità e riproducibilità attesi ; pertanto le prove che i Laboratori stanno eseguendo per il confronto con la metodica di riferimento forniscono, complessivamente, valori strumentali attendibili e utilizzabili allo scopo.

E' stato segnalato che i valori osservati sui campioni C e D (caratterizzati da un maggior livello di contaminazione), pur restando entro i limiti attesi per Rip e Rip , indicano un livello di dispersione tra laboratori leggermente superiore a quello atteso. In considerazione del fatto che le prove di confronto vengono eseguite anche su campioni con contaminazioni decisamente più elevate di quelli utilizzati nella presente prova, è da attendersi quindi che all'aumentare del livello di contaminazione si possano osservare valori di dispersione tra laboratori superiori ai limiti attesi . Allo stato attuale non si ritiene però, che ciò possa risultare condizionante sull'attendibilità complessiva del lavoro che si sta realizzando in considerazione di due punti fondamentali :

- l'accuratezza dell'analisi strumentale (e di conseguenza della stima della Conversione) assumono gradualmente minor rilevanza pratica, man mano che si applicano su campioni a maggior contaminazione batterica (anche per questo in fondo i lavori relativi alla conversione tendono a

privilegiare livelli di contaminazione batterica più tipici o caratteristici del latte normalmente analizzato). E' del resto noto che, stante un limite di conformità per il latte crudo bovino internazionalmente fissato a 100.000 UFC/mL , l'aspetto della precisione della conversione va man mano perdendo di importanza quando si testano campioni che superano, ad esempio, valori di 1.000.000 di UFC;

- al crescere della contaminazione batterica ci si attende comunque un miglior livello di ripetibilità e riproducibilità strumentale, in termini relativi, e ciò sostanzialmente tende a compensare in buona parte la maggior dispersione osservata.

Elaborazione Statistica :
A. Marcolini

IL RESPONSABILE SCIENTIFICO

Dott. G. BOLZONI