



Istituto Superiore di Sanità
Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
**Laboratorio Nazionale di Riferimento per il
latte e i prodotti a base di latte**



IZS Lombardia ed Emilia Romagna
"Bruno Ubertini"
**Centro di Riferenza Nazionale per la
qualità del latte bovino**

Report finale rev. 0

Prova Valutativa Interlaboratorio
per la

**Verifica dello stato di taratura degli strumenti a citometria di flusso (Bactoscan FC) utilizzati
per la determinazione della Carica Batterica Totale nel latte**

Codice PVI: **CBT042015**

Data emissione: 21.07.2015

PVI: **CBT042015**

Determinazione della carica batterica totale mediante metodo con Bactoscan FC

Data esecuzione prova	Maggio 2015
Stato e revisione report	Report finale rev. 0
Codice della prova	CBT042015
Responsabile redazione report	Dr. G. Bolzoni Resp. Centro di Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino
Responsabile elaborazione statistica	A. Marcolini Centro di Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino
Responsabile organizzazione gestionale campioni	Dr.ssa B. Appicciafuoco LNR per il latte e i prodotti a base di latte
Responsabili supervisione e coordinamento	Dr. G. Bolzoni Centro di Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino  Dr.ssa A.M. Ferrini LNR per il latte e i prodotti a base di latte 
Data emissione report	21.07.2015

Centro di Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino
Tel. (+39) 0302290 (541) (225) (246) (284)
Fax (+39) 0302290537; e-mail: crn.qualita.latte@izsler.it

Laboratorio Nazionale di Riferimento per il latte e i prodotti a base di latte
Tel. (+39) 06 4990 2368 (3516)
Fax (+39) 06 4990 2368; e-mail: lnr.latte@iss.it

INFORMAZIONI GENERALI

Laboratori partecipanti

La prova ha coinvolto 34 laboratori, per un totale di 35 apparecchiature.

Tabella 1. Elenco dei laboratori partecipanti

Laboratorio	Città
A.A.F.V.G.	Codroipo (UD)
A.R.A. Basilicata	Potenza
A.R.A. EMILIA ROMAGNA	Mancasale (RE)
A.R.A. Lombardia	Crema
A. R. A. Sardegna	Oristano
A. R. A. Veneto	Padova
Centrale del Latte di Firenze, Pistoia e Livorno S.p.A.	Firenze
Centrale del latte di Roma S.p.A.	Roma
Centro Agrochimico Regionale ASSAM	Jesi (AN)
Centro Lattiero Caseario e Agroalimentare	Parma
CHELAB S.r.l.	Resana (TV)
Consulenze agroindustriali Servizi tecnici avanzati CASTALAB di Bussolati e Miti	Fidenza (PR)
DIANO LATTE S.r.l.	Sassano (SA)
EPTA NORD S.r.l.	Conselve (PD)
FEDERAZIONE LATTERIE ALTO ADIGE	Bolzano
GRANAROLO S.p.A.	Bologna
IZS LAZIO E TOSCANA	Grosseto
IZS LAZIO E TOSCANA	Latina
IZS LAZIO E TOSCANA	Roma
IZS LOMBARDIA E EMILIA ROMAGNA	Piacenza
IZS LOMBARDIA E EMILIA ROMAGNA	Brescia
IZS PIEMONTE LIGURIA E VALLE D'AOSTA	Torino
IZS SARDEGNA	Sassari
IZS SICILIA	Palermo
IZS SICILIA	Ragusa
IZS UMBRIA E MARCHE	Perugia
LAB ARTEST	Modena
LABORATORI VAILATI S.r.l.	San Paolo (BS)
Made HSE	Gazoldo degli Ippoliti (MN)
PARMALAT S.p.A.	Piana di Monte Verna (CE)
Regione Valle d'Aosta - Assessorato Agricoltura e Risorse naturali - Settore Latte	Saint-Christophe (AO)
TECNOCASEARIA S.r.l.	Sovizzo (VI)
TRENTINGRANA -CONCAST sca	Trento
VENETO AGRICOLTURA	Thiene (VI)

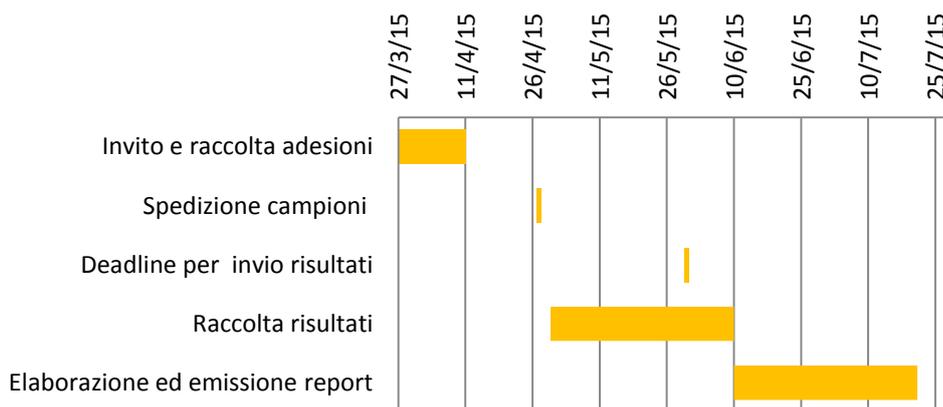
ORGANIZZAZIONE DELLA PROVA

I laboratori sono stati invitati a partecipare tramite e-mail; quelli che hanno aderito alla prova sono stati poi informati in merito agli aspetti organizzativi ed hanno ricevuto, contestualmente al materiale, il protocollo operativo per l'esecuzione della prova.

I campioni sono stati spediti a fine aprile 2015 e, in considerazione delle caratteristiche del materiale, è stata richiesta l'esecuzione delle prove in un giorno a scelta entro il termine per l'invio dei risultati fissato al 30 maggio.

Tutti i laboratori hanno rispettato le indicazioni operative fornite e nessuno ha presentato osservazioni in merito al processo di trasporto/ricezione del materiale.

Gantt delle attività:



FINALITÀ DELLA PROVA

- Finalità principale della prova è stata la definizione del titolo del lotto di produzione (CBT91120-2015) del materiale di riferimento, per cui si è cercato di coinvolgere il maggior numero dei laboratori che attualmente utilizzano il Bactoscan FC per la determinazione della carica batterica totale nel latte.
- In second'ordine sono state valutate le performances dei singoli partecipanti in relazione ai risultati complessivi della prova.
- Infine è stata condotta anche una valutazione della correlazione tra i dati forniti dai laboratori relativamente ai parametri di controllo strumentale e i corrispondenti esiti (z-scores) ottenuti. Riteniamo che questa analisi dei dati possa infatti fornire informazioni aggiuntive nella valutazione delle performances dei laboratori e, al tempo stesso, irrobustire la stima statistica per l'attribuzione del titolo al materiale di riferimento.

MATERIALE

Ogni laboratorio partecipante ha ricevuto 2 flaconi (“A” e “B”) di uno stesso materiale (unico lotto di produzione) con l’indicazione di eseguire 2 repliche per ogni flacone. Ogni flacone conteneva latte vaccino liofilizzato addizionato di flora microbica mista selezionata, da ricostituire ed analizzare senza altre fasi di preparazione.

Omogeneità e stabilità del materiale

La valutazione di omogeneità è stata eseguita preliminarmente dall’organizzatore su circa il 5% dei flaconi allestiti e poi verificata mediante ANOVA sulla base dei dati della presente prova interlaboratorio. L’esito delle 2 valutazioni ha fornito valori concordanti, con:

scarto tipo fra flaconi S_{bb} quantificabile in 13 IBC/ μ L.

Il livello di omogeneità osservato è conforme, per le finalità d’uso, al criterio definito in ISO 13528:2005 B.2.

Studi di stabilità in corso su alcuni materiali liofilizzati precedentemente preparati dal CRNQLB e utilizzati come materiali di riferimento per la valutazione dello stato di taratura degli strumenti dimostrano, ad oggi, una stabilità di almeno 7 anni. Pertanto non è stato ritenuto necessario verificare la stabilità del materiale specificamente preparato per questa occasione dato il breve lasso di tempo tra la produzione del materiale e l’esecuzione della prova.

RISULTATI ED ELABORAZIONE

Riferimenti operativi

Per l’elaborazione sono stati adottati, per quanto applicabili, i principi contenuti in

- ISO 13528:2005
- ISO 5725-2:1994
- ISO 17043:2010
- ISO 16297:2013.

Per l’esecuzione dei calcoli correlati all’elaborazione sono stati impiegati fogli di calcolo (Excel®) e procedure statistiche in codice R.

Dati grezzi

Gli esiti forniti dai laboratori partecipanti sono riportati in forma completa in Tabella 2 (in IBC/ μ L) .

Tabella 2. Risultati forniti dai partecipanti (IBC/ μ L)

Lab	A		B	
	Replica 1	Replica 2	Replica 1	Replica 2
1	624	595	607	602
2	600	608	606	618
3	632	642	625	599
4	672	670	703	688
5	544	543	560	562
6	634	644	644	638
7	579	576	529	575
8	608	608	618	612
9	513	478	503	495
10	604	638	641	623
11	675	658	710	685
12	644	633	631	641
13	651	631	667	653
14	560	569	553	551
15	609	640	832	N.D.
16	697	698	656	666
17	618	597	648	656
18	632	644	630	636
19	663	652	668	661
20	609	606	559	570
21	668	684	677	693
22	651	690	650	691
23	706	672	654	674
24	595	622	620	625
25	673	644	628	636
26	629	664	634	635
27	645	649	663	668
28	545	520	511	528
29	658	688	655	668
30	466	476	522	507
31	638	615	666	643
32	658	690	693	709
33	528	517	577	563
34	611	609	587	582
35	574	564	629	602

Il lab. 15 è stato escluso dall'elaborazione dei risultati per il campione B in quanto l'unico dato trasmesso è risultato anomalo in termini di contributo alla varianza di laboratorio (Cochran's test, dettaglio calcolo non riportato).

Non si è proceduto alla trasformazione logaritmica delle osservazioni preliminarmente all'elaborazione. Considerato l'esito non significativo all'analisi Anova della verifica eseguita sull'omogeneità dei flaconi, i dati di ogni singolo laboratorio provenienti dai 2 diversi flaconi sono stati aggregati in unica serie di 4 determinazioni ai fini dell'elaborazione (con l'unica eccezione del lab. 15).

Definizione dello scarto tipo assegnato per la prova $\hat{\sigma}$

L'esistenza di un circuito periodico di prove interlaboratorio a livello nazionale (L.S.L. A.I.A. Roma), riguardante la stessa tipologia di strumento analitico, cui molti dei partecipanti alla presente prova prendono parte ormai da molti anni, rende disponibile un riferimento storico, consolidato e diffuso per la definizione della relazione funzionale fra media di livello, S_r ed S_R . A tale scopo è stata eseguita una elaborazione dei dati (secondo ISO 5725-2:1994 7.5 opzione III) disponibili nel periodo 2010-2014 (Fonte: in http://www.aia.it/lsl/ring_test_laboratorio_standard_latte.htm.) per un totale di 67 campioni, distribuiti in un range di 18-18900 IBC/ μ L. Da questa relazione sono stati stimati i valori attesi in funzione del livello della presente prova.

valore scarto tipo assegnato per la prova: $\hat{\sigma} = 118 \text{ IBC}/\mu\text{L}$

La stima ottenuta in questo modo appare più congrua al tipo e la finalità della presente prova per la valutazione delle performances dei laboratori partecipanti, sia rispetto all'assunzione dei parametri di scarto atteso dichiarati dal Produttore dello strumento sia rispetto a quelli deducibili dalle osservazioni scaturite soltanto dalla presente prova.

La Tabella 3, mostra a confronto i parametri di precisione calcolati utilizzando rispettivamente i risultati della presente prova (PVI 2015) e quelli ricavati da prove interlaboratorio nazionali degli ultimi 4 anni (PVI nazionali 2010-2014). I dati sono riportati in log10, RSD e IBC.

Tabella 3. Definizione del valore di scarto tipo target per la prova

parametro	PVI 2015			PVI nazionali 2010-2014		
	log10	GRSD	IBC	log10	GRSD	IBC
S_r	0,013	3%	19	0,016	3,8%	24
S_R	0,040	10%	61	0,077	19,3%	120
S_{lab}	0,038	9%	57	0,075	18,8%	117
S_{target}	0,039	9%	58	0,075	18,9%	118

Definizione del valore assegnato X e della sua incertezza

Il valore atteso è definito come valore consensuale di tutti i partecipanti e stimato come media robusta X in base alle indicazioni di ISO 13528:2005 C.1. Per l'applicazione dell'algoritmo di calcolo è stato utilizzato il software statistico R (pacchetto MetRology, funzione algA).

$X=623.35 \sim 623$

L'incertezza tipo u_x del valore assegnato è quindi stimata da:

$$u_x = \frac{1.25 \times s^*}{\sqrt{p}} = 10.84$$

Con

$s^* = 51.3$, scarto tipo delle medie di laboratorio stimato mediante il medesimo algoritmo sopra citato
 $p = 35$, n° di apparecchiature coinvolte nella stima.

L'incertezza tipo così stimata appare congrua rispetto al criterio definito in ISO 13528:2005 4.2

$$u_x \leq 0.3\hat{\sigma} \quad (10.84 \leq 0.3 \times 118)$$

Pertanto non verrà inclusa nell'interpretazione dei risultati della prova (stima degli z-score).

valore assegnato per la prova: $X = 623 \pm 22$ IBC/ μ L (K=2; P \approx 95%)

Calcolo delle statistiche di prestazione

Le prestazioni del laboratorio vengono valutate in termini di z-score, stimati da

$$z = \frac{(x - X)}{\hat{\sigma}}$$

Dove x è la media di laboratorio (strumento).

Per la valutazione dell'esito valgono i seguenti criteri:

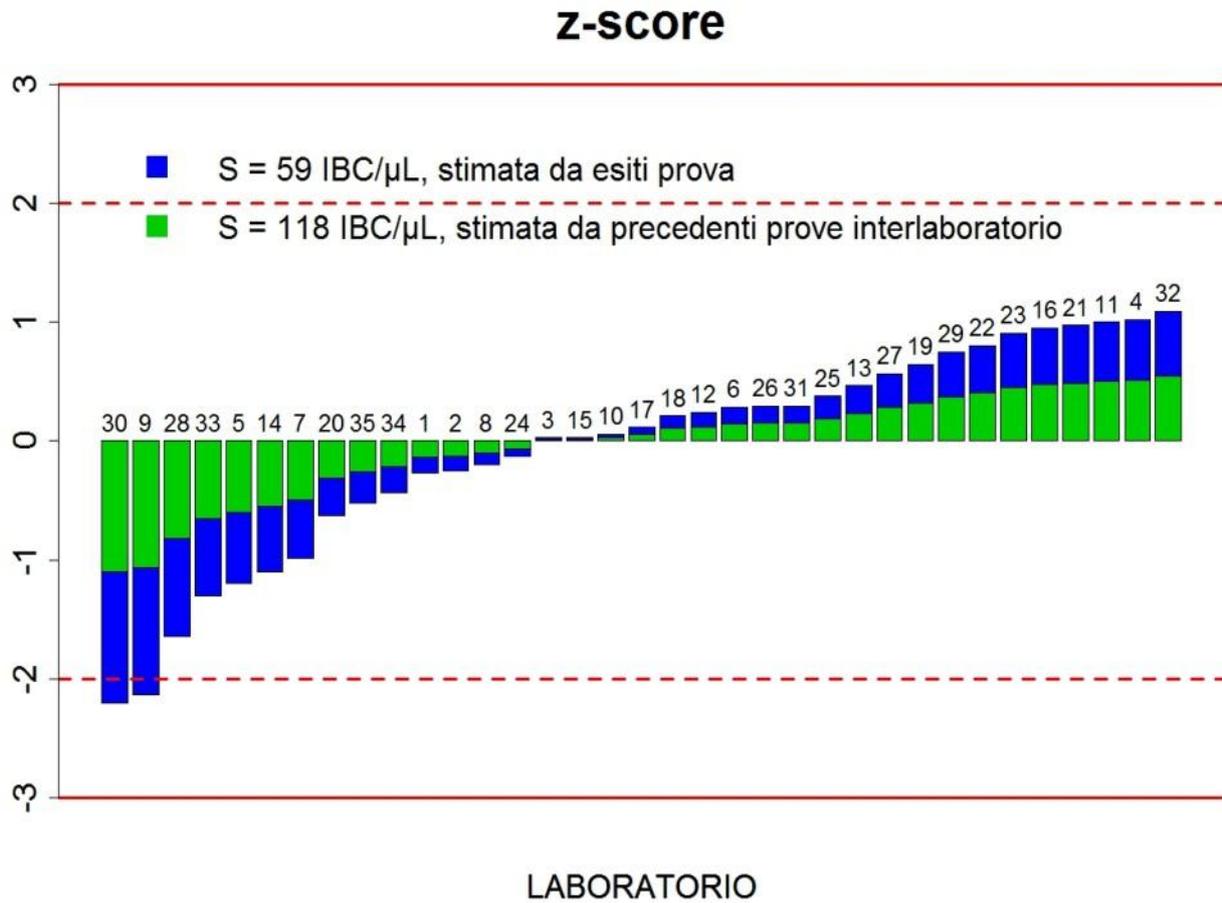
- $|z| \leq 2$: Accettabile
- $2 < |z| \leq 3$: Questionabile. Il laboratorio dovrebbe verificare il proprio operato
- $|z| > 3$: Non accettabile. Sono necessarie verifiche ed azioni correttive

I valori di z-score sono riepilogati in Tabella 4, insieme ad altre statistiche stimate dai dati grezzi. Nel Grafico 1 i valori di Z-score stimati in base al valore di $\hat{\sigma}$ definito per la prova (sulla base delle precedenti prove interlaboratorio realizzate per il medesimo metodo) ed in base al valore di $\hat{\sigma}$ stimabile dalla presente prova, sono esposte in forma grafica.

Tabella 4. Riepilogo statistiche della prova interlaboratorio

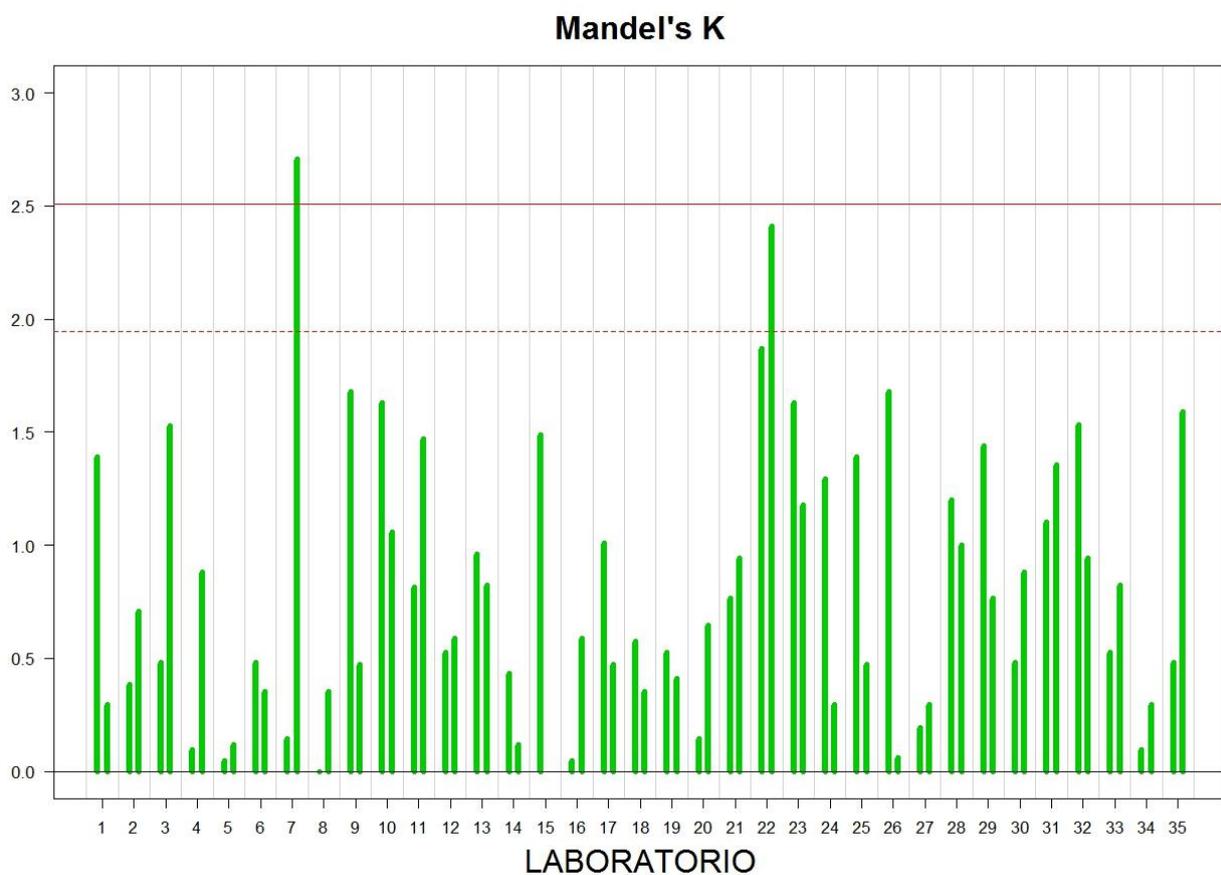
Lab	Media IBC/ μ L	n°dati	scarto tipo di ripetibilità		z-score	
			IBC/ μ L	C.V.%	$\hat{\sigma}$ dalla prova stessa	$\hat{\sigma}$ da prove interlaboratorio
1	607	4	12	2,0%	-0,28	-0,14
2	608	4	7	1,2%	-0,26	-0,13
3	625	4	18	2,9%	0,03	0,01
4	683	4	15	2,3%	1,04	0,51
5	552	4	10	1,8%	-1,22	-0,60
6	640	4	5	0,8%	0,29	0,14
7	565	4	24	4,2%	-1,00	-0,49
8	612	4	5	0,8%	-0,20	-0,10
9	497	4	15	3,0%	-2,17	-1,07
10	627	4	17	2,7%	0,06	0,03
11	682	4	22	3,2%	1,02	0,50
12	637	4	6	1,0%	0,25	0,12
13	651	4	15	2,3%	0,47	0,23
14	558	4	8	1,5%	-1,12	-0,55
15	625	2	22	3,5%	0,03	0,01
16	679	4	21	3,2%	0,97	0,48
17	630	4	27	4,3%	0,12	0,06
18	636	4	6	1,0%	0,22	0,11
19	661	4	7	1,0%	0,66	0,32
20	586	4	25	4,3%	-0,64	-0,31
21	681	4	11	1,6%	0,99	0,49
22	671	4	23	3,4%	0,82	0,40
23	677	4	22	3,2%	0,92	0,45
24	616	4	14	2,2%	-0,13	-0,06
25	645	4	20	3,0%	0,38	0,19
26	641	4	16	2,5%	0,30	0,15
27	656	4	11	1,7%	0,57	0,28
28	526	4	14	2,7%	-1,67	-0,82
29	667	4	15	2,2%	0,76	0,38
30	493	4	26	5,3%	-2,25	-1,10
31	641	4	21	3,3%	0,30	0,15
32	688	4	21	3,1%	1,11	0,55
33	546	4	28	5,2%	-1,32	-0,65
34	597	4	15	2,5%	-0,44	-0,22
35	592	4	29	4,9%	-0,53	-0,26

Grafico 1 . Valori di z-score calcolati per ogni laboratorio rispetto ai 2 valori di $\hat{\sigma}$ assegnati



Infine, per un quadro più dettagliato delle ripetibilità analitiche ottenute dai laboratori sul singolo flacone, vengono riportate per ciascun laboratorio le stime di Mandel's K per gli scarti tipo fra repliche di laboratorio, secondo le indicazioni di ISO 13528:2005 8.4, (Grafico 2).

Grafico 2. Distribuzione delle misure di ripetibilità standardizzate (Mandel's K)



CONCLUSIONI SULLA PROVA

- Ripetibilità analitica: un solo laboratorio presenta un valore maggiore del limite indicato per $P=99\%$ e 2 repliche ($K=2.51$), per uno solo dei 2 flaconi analizzati. La differenza relativa fra le due repliche osservata (9%) non appare comunque anomala se confrontata con il limite di differenza critica relativo accettabile (11%) sulla base dei parametri di precisione definiti dall'andamento delle prove interlaboratorio nazionali prese in considerazione (per $P\approx 95\%$). Complessivamente, sull'insieme dei dati, la ripetibilità analitica a livello di singolo flacone (espressa come C.V.%) è pari a circa il 2% , e sale al 3% a livello di laboratorio/strumento, ampiamente inferiore al valore di $3,8\%$ (GRSD) atteso sulla base di quanto osservato nelle prove interlaboratorio nazionali.
- z-score: tutti i laboratori presentano valori ampiamente nei limiti di accettabilità, per il valore di $\hat{\sigma}$ utilizzato e stimato da prove interlaboratorio precedenti (periodo 2010-2014) e che abbiamo assunto come $\hat{\sigma}$ target per la presente elaborazione.

Tuttavia, utilizzando il valore di $\hat{\sigma}$ ricavato dagli esiti della presente prova, 2 laboratori risulterebbero di poco oltre il limite di allerta (lab 9: z-score = -2,17; lab 30: z-score = -2,25).

STIMA SPERIMENTALE AGGIUNTIVA

Ai partecipanti è stato richiesto di trasmettere il livello di determinazione ottenuto sui campioni di controllo BCS forniti dal costruttore delle apparecchiature, nella data più prossima all'esecuzione delle prove interlaboratorio. Tale controllo, previsto dal manuale dello strumento tra quelli periodici, richiede una lettura strumentale entro limiti di accettabilità predefiniti (e variabili con il lotto di produzione del prodotto) come test di funzionalità strumentale.

Va sottolineato che tali letture non sono equivalenti alle letture di cellule batteriche (oggetto della prova) in quanto determinate da particelle di materiale sintetico di dimensioni uniformi. Il controllo non è quindi paragonabile a quello fornito da un materiale di riferimento. La reale finalità è quella di fornire, nel tempo, un indicatore di corretta funzionalità strumentale con particolare riferimento allo stato di messa a fuoco.

Premesso che non è dato sapere se le determinazioni BCS siano effettivamente rappresentative della condizione strumentale nel momento preciso della prova interlaboratorio (posto che ciascun laboratorio ricorre al controllo BCS con frequenza diversa), si è comunque proceduto ad una valutazione dei dati disponibili.

I dati e le relative elaborazioni sono riepilogati in tabella 5 (non tutti i partecipanti hanno di fatto comunicato i dati richiesti). Tra quelli disponibili 1 solo laboratorio ha dichiarato un livello di lettura esterno ai limiti indicati per quel lotto di prodotto BCS (verificati dai certificati forniti dal produttore Foss, e disponibili sul relativo sito web).

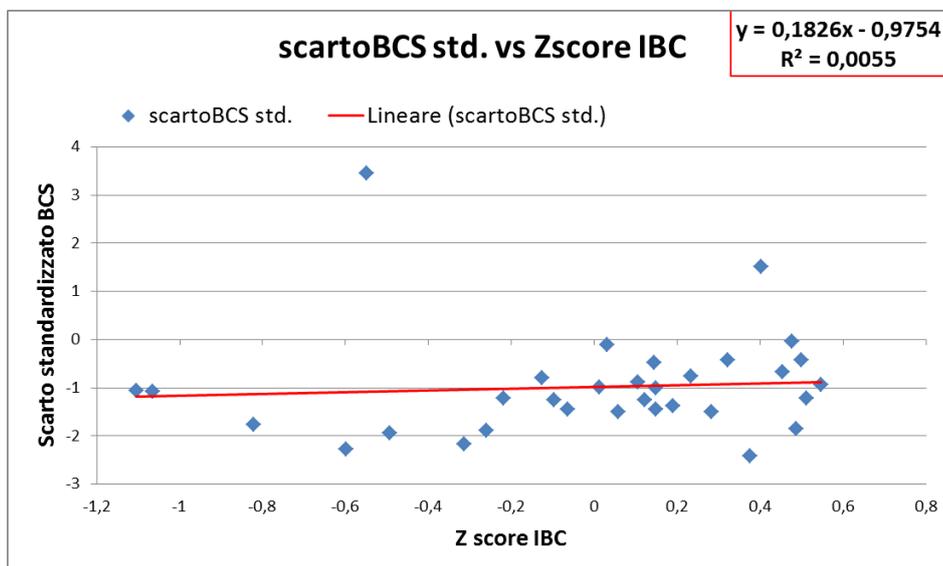
Tabella 5. Letture BCS comunicate dai partecipanti

Codice laboratorio	lotto	valore riferimento	limite inferiore	limite superiore	scarto tipo Val. rif.	Letture BCS IBC	scarto BCS standardizzato
1	N.D.						
2	6004911	2112	1795	2428	129	2010	-0,79
3	6005194	2021	1718	2324	124	1899	-0,99
4	6005546	1964	1670	2259	120	1818	-1,21
5	6005393	1957	1664	2251	120	1685	-2,27
6	6004852	2030	1726	2335	124	1971	-0,47
7	6005546	1964	1670	2259	120	1730	-1,95
8	6005000	1954	1661	2247	120	1804	-1,25
9	6005546	1964	1670	2259	120	1834	-1,08
10	6005404	2116	1799	2433	129	2103	-0,10
11	6004877	2043	1737	2350	125	1990	-0,42
12	6005721	2044	1737	2350	125	1886	-1,26
13	6005089	1924	1636	2213	118	1834	-0,76
14	6004852	2030	1726	2335	124	2459	3,45
15	6005194	2021	1718	2324	124	N.D.	
16	6005113	1987	1689	2285	122	1982	-0,04
17	6005089	1924	1636	2213	118	1748	-1,49
18	6005393	1957	1664	2251	120	1852	-0,88
19	6005546	1964	1670	2259	120	1912	-0,43
20	6005546	1964	1670	2259	120	1703	-2,17
21	6005404	2116	1799	2433	129	1876	-1,85
22	6004880	2056	1748	2365	126	2247	1,52
23	6005546	1964	1670	2259	120	1884	-0,67
24	6005393	1957	1664	2251	120	1783	-1,45
25	6005315	2074	1763	2385	127	1899	-1,38
26	6005321	1942	1650	2233	119	1769	-1,45
27	6005315	2074	1763	2385	127	1883	-1,50
28	6005582	2194	1865	2523	134	1956	-1,77
29	6005582	2194	1865	2523	134	1869	-2,42
30	6004928	1989	1691	2287	122	1859	-1,07
31	6005582	2194	1865	2523	134	2058	-1,01
32	6005546	1964	1670	2259	120	1851	-0,94
33	6005673	2116	1798	2433	130	N.D.	
34	6005089	1924	1636	2213	118	1780	-1,22
35	6005089	1924	1636	2213	118	1702	-1,88

In considerazione dei differenti lotti attualmente in uso presso i laboratori partecipanti, si è calcolato lo scarto standardizzato rispetto al valore di riferimento, assumendo per tutti i lotti uno scarto tipo del valore di riferimento stimabile da distribuzione triangolare entro i limiti superiore ed inferiore del valore di riferimento.

I valori così ottenuti (scarto BCS standardizzato) sono stati posti a confronto con i valori di Z-score osservati per ciascun laboratorio partecipante; la correlazione (teoricamente ipotizzabile) fra le due serie di dati non è risultata statisticamente significativa (grafico 3). Non si è rilevata una significativa correlazione fra i due parametri, neppure eliminando il dato apparentemente più “anomalo”, relativo al laboratorio 14 (analisi fuori range di accettabilità ma con z-score decisamente soddisfacente).

Grafico 3. Valutazione correlazione tra lettura BCS e z-score ottenuto nella presente prova



In conclusione, in base a quanto osservato in questo primo tentativo, i valori di riferimento attesi per BCS seppur generalmente sottostimati (ma entro i limiti) dai diversi laboratori, non sembrano risultare correlabili con il livello di z-score (coefficiente di determinazione R^2 prossimo a 0); non costituirebbero quindi un elemento di giudizio o di valutazione preventiva delle possibilità del laboratorio di ottenere un prefissato livello di performances.

In prospettiva futura appare quindi necessario disporre anche dei dati di “Mean Signal” forniti dal BCS e del livello di discriminatore strumentale per approfondire questo tipo di valutazioni. D'altra parte è noto che sia nei campioni di latte crudo che, a maggior ragione, nei materiali di riferimento a base batterica uno degli elementi di maggior rilevanza nella precisione del conteggio è dato dalla composizione della matrice rispetto al livello di discriminante dello strumento. Analisi di questa natura possono essere realizzate graficamente dagli spettri degli impulsi (PHA graphic) forniti dagli strumenti. E' infatti frequente che con distribuzione degli impulsi non ottimali (come è invece quella garantita dal BCS di composizione sintetica) il conteggio degli impulsi di un materiale di riferimento risulti fortemente alterato senza che però ciò sia dovuto al numero di batteri presenti né, tantomeno, ad un malfunzionamento dello strumento.



In conclusione, con questo primo tentativo riteniamo interessante avviare uno studio più approfondito sui parametri di funzionamento strumentale che, in prospettiva futura, potrebbero servire sia per selezionare dati da utilizzare per la definizione del titolo dei materiali di riferimento, sia per comprendere meglio l'origine di eventuali risultati non conformi da parte di singoli laboratori nel corso di prove interlaboratorio.