



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



IZS Lombardia ed Emilia Romagna
"Bruno Ubertini"

**Centro di Referenza Nazionale per la
qualità del latte bovino**

Report finale rev. 0

Prova Valutativa Interlaboratorio

per la

Verifica della funzionalità e dello stato di taratura degli strumenti a citometria di flusso (Bactoscan FC) utilizzati per la produzione dei dati confluenti nel progetto per la definizione della retta di conversione per la determinazione della carica batterica totale nel latte di bufala (PRC 008/2017)

Codice PVI: **CBT2018**

Data emissione: 17 dicembre 2018

Codice della prova	CBT2018
Responsabili organizzazione prova	Dr.ssa AM Ferrini LNR per il latte e i prodotti a base di latte (ISS) Dr. G. Bolzoni Centro di Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino (IZS LER)
Responsabile redazione report	Dr. G. Bolzoni
Responsabile elaborazione statistica	A. Marcolini Centro di Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino
Responsabile organizzazione gestionale campioni	Dr.ssa AM Ferrini
Responsabili supervisione e coordinamento	Dr. G. Bolzoni Dr.ssa A.M. Ferrini
Data emissione report	17.12.2018

Dr. G. Bolzoni



Responsabile

Centro di Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino –IZS LER

Tel. (+39) 0302290 (541) (225) (246) (284)

Fax (+39) 0302290537; e-mail: crn.qualita.latte@izsler.it

Dr.ssa AM Ferrini



Responsabile

Laboratorio Nazionale di Riferimento per il latte e i prodotti a base di latte –ISS

Tel. (+39) 06 4990 2368 (3516)

Fax (+39) 06 4990 2368; e-mail: lnr.latte@iss.it

INFORMAZIONI GENERALI

Laboratori partecipanti

Alla prova hanno inizialmente aderito 13 laboratori, per un totale di 14 apparecchiature. I laboratori sono stati individualmente codificati in modo anonimo.

Tabella 1. Elenco dei laboratori partecipanti

Laboratorio	Città
A.A.F.V.G.	Codroipo (UD)
A.R.A. Basilicata	Potenza
A.R.A. Piemonte	Cuneo
DIANO LATTE S.r.l.	Sassano (SA)
EPTA NORD S.r.l.	Conselve (PD)
IZS ABRUZZO e MOLISE	Lanciano (CH)
IZS LAZIO E TOSCANA	Latina
IZS LAZIO E TOSCANA	Roma
IZS LOMBARDIA E EMILIA ROMAGNA	Brescia
IZS MEZZOGIORNO	Tuoro (CE)
IZS MEZZOGIORNO	Fuorni (SA)
IZS PUGLIA e BASILICATA	Putignano (BA)
IZS SICILIA	Ragusa

ORGANIZZAZIONE DELLA PROVA

12.09.2018	comunicazione dell'organizzazione della presente prova tramite e-mail a tutti i laboratori partecipanti alle prove afferenti al PRC 008/2017 per la definizione della retta di conversione per la determinazione della carica batterica totale nel latte di bufala
25.09.2018	spedizione dei campioni per posta con raccomandata con ricevuta di ritorno e invio e-mail delle istruzioni operative e della scheda risultati
30.10.2018	deadline consegna risultati
17.12.2018	spedizione report

FINALITÀ DELLA PROVA

La prova è stata finalizzata alla verifica della funzionalità e dello stato di taratura degli strumenti utilizzati per la produzione dei dati confluenti nel progetto per la definizione della retta di conversione per la determinazione della carica batterica totale nel latte di bufala (PRC 008/2017) a supporto del corretto funzionamento ed utilizzo delle strumentazioni analitiche utilizzate dai laboratori partecipanti.

Considerando inoltre che tutti i laboratori coinvolti partecipano regolarmente ad un programma di valutazione esterna di qualità, al fine di integrare il nostro risultato puntuale con informazioni relative al periodo precedente la prova (a partire dall'inizio del progetto), si è ritenuto opportuno raccogliere

anche dati sugli esiti dell'ultimo PT per la carica batterica nel latte con metodo optofluorimetrico a cui i partecipanti avevano preso parte.

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, (in un solo caso, essendo disponibili due strumenti, è stata messa a disposizione una doppia serie di campioni). Ogni flacone conteneva latte vaccino liofilizzato addizionato di flora microbica mista selezionata, sottoposto a liofilizzazione e 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 del lotto di produzione ed è stata inoltre verificata nel corso della presente prova interlaboratorio. Il livello di omogeneità ha definito uno scarto tipo fra flaconi Sbb quantificabile in 26 IBC/ μ L, conforme, per le finalità d'uso, al criterio definito da ISO : 13528.

Studi di stabilità sui materiali prodotti dal CRNQLB per la valutazione dello stato di taratura degli strumenti dimostrano, ad oggi, una stabilità di almeno 8 anni. La stabilità non è stata pertanto ritestata in occasione di questa specifica spedizione.

DATI GREZZI ED ELABORAZIONE

Dati grezzi

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

Tabella 2. Dati grezzi (IBC/ μ L) ricevuti dai partecipanti

Strumento/Laboratorio	Flacone A		Flacone B	
	Replica 1	Replica 2	Replica 1	Replica 2
1*	505	511	517	515
2	540	532	524	539
3	511	532	511	527
4	535	542	526	542
5	504	503	484	491
6	546	554	543	553
7	519	500	482	464
8	486	501	511	511
9	532	534	480	519
10	531	538	500	495
11	//	//	//	//
12	581	589	530	543
13	491	503	486	498

Note :

* I dati del laboratorio n°1 per uno dei 2 strumenti utilizzati non sono stati inseriti nell'elaborazione, per segnalazione da parte del laboratorio di una incompleta ricostituzione del materiale

// : dati non pervenuti

Riferimenti operativi

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

- ISO 13528
- ISO 5725-2
- ISO 17043
- ISO 16297

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

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

L'esistenza di un circuito periodico di prove interlaboratorio a livello nazionale (L.S.L. A.I.A. Roma) per la stessa prova e la stessa tipologia di strumento analitico, cui molti dei partecipanti alla presente prova prendono parte ormai da anni, rende disponibile un riferimento appropriato e consolidato 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 2010-2017 (Fonte: in http://www.aia.it/lsl/ring_test_laboratorio_standard_latte.htm) per la definizione dello scarto tipo atteso per la presente prova.

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

Da dati PT AIA (elaborazione sul periodo 2014 - 2017)			
parametro	log10	GRSD	IBC
S_r	0,020	4,7%	24
S_R	0,080	20,2%	105
S_{lab}	0,077	19,5%	101
S_{target}	0,078	19,7%	102

Il valore dello scarto tipo atteso per la prova è quindi risultato stimabile in : $\hat{\sigma} = 102 \text{ IBC}/\mu\text{L}$

Definizione del valore assegnato X e della sua incertezza

Nell'elaborazione successiva non si è proceduto alla trasformazione logaritmica delle osservazioni e, considerato l'esito positivo della verifica dell'omogeneità dei campioni, i dati di ogni singolo laboratorio provenienti dai 2 diversi flaconi sono stati aggregati in unica serie di 4 determinazioni .

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. Per l'applicazione dell'algoritmo di calcolo è stato utilizzato il software statistico R (pacchetto MetRology, funzione algA) ed è stato ottenuto il valore:

$$X = 518,4581 \sim 518$$

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

$$u_x = \frac{1,25 \times s^*}{\sqrt{p}} = 8,66$$

con

$s^* = 24$ scarto tipo delle medie di laboratorio stimato mediante il medesimo algoritmo sopra citato

$p = 12$ n° di apparecchiature coinvolte nella stima.

L'incertezza tipo così stimata risulta congrua rispetto al criterio definito in ISO 13528

$$u_x \leq 0,3\hat{\sigma}$$

risultando $8,66 \leq 0,3 \times 102$

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

valore assegnato per la prova: $X = 518 \pm 9$ 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 eseguire delle verifiche
- $|z| > 3$: Non accettabile. Sono necessarie verifiche ed azioni correttive

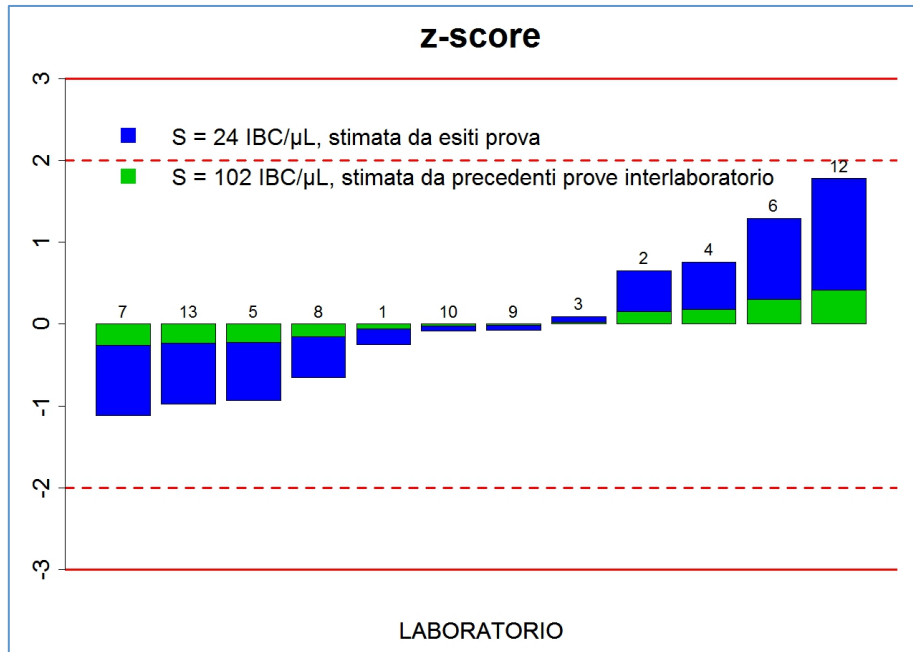
I valori di z-score dei singoli laboratori sono riepilogati in Tabella 4, insieme ad altre statistiche stimate dai dati grezzi.

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.%	$\hat{\sigma}$ da prove interlaboratorio	$\hat{\sigma}$ dalla stessa prova
1	512	4	5	1,0	-0,06	-0,25
2	534	4	7	1,4	0,15	0,66
3	520	4	11	2,1	0,02	0,09
4	536	4	8	1,4	0,18	0,76
5	496	4	10	2,0	-0,22	-0,94
6	549	4	5	1,0	0,30	1,29
7	491	4	24	4,8	-0,26	-1,11
8	502	4	12	2,4	-0,15	-0,66
9	516	4	25	4,9	-0,02	-0,07
10	516	4	22	4,2	-0,02	-0,08
12	561	4	29	5,1	0,42	1,78
13	495	4	8	1,5	-0,23	-0,98

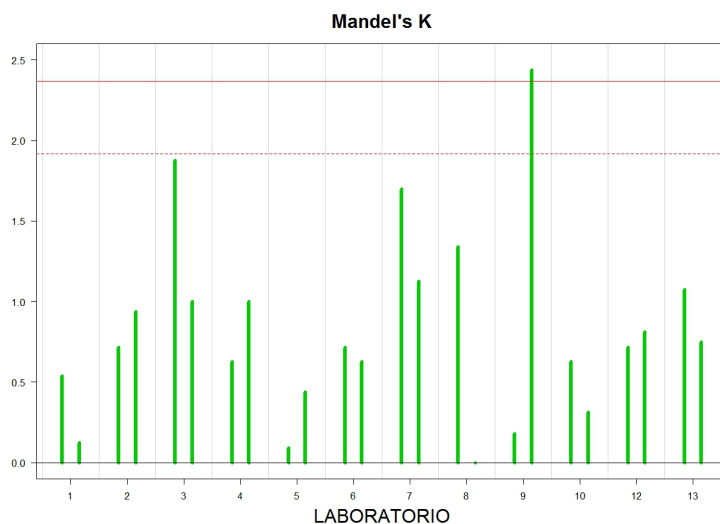
Nel Grafico 1 sono riportati i valori di z-score stimati in base al valore di $\hat{\sigma}$ assegnato per la prova (sulla base delle precedenti prove interlaboratorio per il medesimo metodo) e, rispettivamente, in base al valore di $\hat{\sigma}$ calcolato per la presente prova.

Grafico 1 . Valori di z-score calcolati per ogni laboratorio rispetto ai due valori di $\hat{\sigma}$ (da prove precedenti \hat{x} e per la prova presente \hat{x})



Infine in Grafico 2 è inoltre riportata, per ciascun partecipante e per ciascun campione, l'evidenziazione grafica della valutazione della ripetibilità delle repliche sul singolo flacone (Test k di Mandel secondo ISO 5725-2).

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



In un solo caso e per una soltanto delle copie di repliche sul medesimo flacone, si osserva un valore superiore a quanto stimato per le condizioni della prova ($P=99\%$ e 2 repliche, $K=2.37$). Ciò non influisce ovviamente sulla stima dei risultati della prova (z-score) ma permette di confermare che la differenza relativa fra le due repliche osservata dell'8% non risulta anomala rispetto al corrispondente limite di differenza critica accettabile (14%) ricavabile sulla base dei parametri di precisione in tab. 3 calcolati dall'andamento delle prove interlaboratorio (per $P \approx 95\%$)

ELABORAZIONI AGGIUNTIVE

Considerando che la presente prova ha permesso di ottenere una valutazione sulla qualità del dato “attuale” fornito dagli strumenti in uso presso i laboratori partecipanti al “Progetto di ricerca per la definizione della retta di conversione per la determinazione della carica batterica totale nel latte di bufala”, è sembrato utile integrare la valutazione estendendola all’ultima prova interlaboratorio a cui i partecipanti hanno aderito.

Tenuto conto che i risultati ricevuti si riferiscono a round differenti di un unico circuito e che, in genere, le osservazioni riguardavano 4 campioni con differente livello di contaminazione batterica, analizzati in doppia replica, e valutati separatamente dagli altri (z-score di campione) è possibile fornire un quadro di insieme degli esiti ottenuti da ciascun laboratorio (Tabella 5).

Anche in questo caso appare un quadro complessivo sostanzialmente favorevole. Indipendentemente infatti da situazioni occasionali o puntiformi appare confermato che anche in un maggior ambito temporale i laboratori partecipanti garantiscono un sostanziale livello di uniformità delle prestazioni strumentali per il metodo di prova alternativo utilizzato nell’ambito del progetto di ricerca.

Tabella 5. z-score per 4 campioni in prove interlaboratorio precedenti

LAB	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4
1	1,42	-0,5	-0,13	-0,13
2	-0,18	-0,17	0	-0,28
3	0,56	-0,23	0,21	0,06
4	1,15	1,69	1,75	2,03
5	-1,33	0,18	0,55	0,58
6	-0,19	2,69	1,69	2,18
7	1,2	0,93	-1,57	-1,16
8	-0,38	-1,25	-0,51	-1,37
9	0,27	1,58	2,1	1,42
10	1,18	-1,68	-1,37	-1,59
12	1,74	1,56	1,86	1,54
13	1,15	1,7	0,82	1,87

Un ulteriore ed indiretto elemento di verifica delle condizioni operative degli strumenti utilizzati può essere tratto dalle osservazioni relative al reagente “BCS” fornito dal produttore degli strumenti (in differenti lotti di produzione) per i controlli periodici delle condizioni operative delle componenti ottiche degli strumenti. Senza entrare in specifiche valutazioni che esulano dalla presente prova, appare comunque utile richiamare questo tipo di controllo nel caso si utilizzino matrici fisicamente differenziate dai campioni di latte crudo; la composizione della matrice potrebbe infatti avere influenza sull’esito finale dei conteggi batterici nel caso di occasionali scostamenti nel valore di controllo e dei rispettivi limiti del BCS. In linea teorica anche questo controllo potrebbe essere utile nell’analisi, ad esempio, di occasionali valori di z-score non soddisfacenti nel corso di specifiche prove

interlaboratorio. A scopo informativo si fornisce in tabella 6 una sintesi delle comunicazioni fornite dai laboratori partecipanti .

Tabella 6 - Lotto di BCS in uso e relativi valori di lettura

LAB.	Lotto	Lettura IBC	Inf.IBC	Sup.IBC
12	6008149	1928	1629	2204
2	6008232	2014	1832	2479
7	6008232	1845	1832	2479
10	6008232	1995	1832	2479
1	6008292	2222	1835	2482
4	6008292	1980	1835	2482
5	6008292	2107	1835	2482
9	6008334	2122	1912	2586
8	6008381	1954	1825	2469

STATO DEI LAVORI DEL PROGETTO DI RICERCA

Soltanto 4 dei laboratori partecipanti alla prova hanno fornito informazioni (numero campioni di latte di bufala analizzati con i due metodi) per un totale di 146 campioni di 15 allevamenti differenti. I laboratori che ancora non hanno avviato le attività hanno fornito dati di previsione per una campionatura da 74 allevamenti per un totale di circa 300 campioni.

La campionatura sembra rimanere un fattore critico (previsto) del progetto in relazione alla concentrazione limitata ad alcune zone geografiche degli allevamenti attivi in modo permanente. Anche per questo motivo si ricorda che i tre Centri di Referenza coinvolti nel progetto (CNR per la qualità del latte bovino (CRNQLB) , CNR sull'igiene e le tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline (CRenBuf) ed il CRN per la qualità del latte e dei prodotti derivati degli ovini e dei caprini (CReLDOC)) hanno dato piena disponibilità per analizzare campioni di latte di bufala di massa aziendale raccolti da Laboratori in zone limitrofe per i quali non fosse possibile partecipare fattivamente al progetto eseguendo le analisi.

CONCLUSIONI SULLA PROVA

- z-score della prova: tutti i laboratori presentano valori ampiamente nei limiti di accettabilità, sia per un valore di $\hat{\sigma}$ stimato da prove interlaboratorio precedenti (target per la presente elaborazione) che utilizzando per la stima il valore di $\hat{\sigma}$ ricavato dalla prova stessa, provando allo stato attuale la perfetta funzionalità e taratura degli strumenti utilizzati nella ricerca
- rispetto e limitatamente alle finalità della presente prova la valutazione delle performances strumentali può ritenersi pertanto conclusa con esito positivo per tutti i partecipanti.