



**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  
determinazione della attività della fosfatasi alcalina con metodo fluorimetrico  
in latte vaccino parzialmente scremato liofilizzato

Codice: PT-IZSLER-ALP1 2014

Data emissione: 12 novembre 2014



PT-IZSLER-ALP1 2014

Determinazione della attività della fosfatasi alcalina con metodo fluorimetrico in latte vaccino parzialmente scremato liofilizzato

Data esecuzione prova	Luglio 2014
Stato e revisione report	REPORT FINALE – rev. 0
Codice della prova	PT-IZSLER-ALP1 2014
Responsabile redazione report	Dr. E. Buffoli 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 M.R. Massaro 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	12 novembre 2014

Centro di Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino

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

Fax (+39) 0302290537 ; e-mail: [crn.qualita.latte@izsler.it](mailto: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](mailto:lnr.latte@iss.it)

## PREFAZIONE

L'attività della fosfatasi alcalina nel latte è considerata il principale indicatore di una corretta pastorizzazione.

Il Reg. (CE) N°1664 /2006, che modifica il Reg. EC N°2074/2005, stabilisce che la norma ISO 11816:1 “Milk and milk products – determination of alkaline phosphatase activity – Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks” è il metodo di riferimento per la determinazione dell'attività della fosfatasi alcalina nel latte .

Al proposito, lo stesso Regolamento recita inoltre:

2. *L'attività di fosfatasi alcalina è espressa in milliunità di attività enzimatica per litro (mU/l). Un'unità di attività della fosfatasi alcalina corrisponde alla quantità di enzima fosfatasi alcalina che catalizza la trasformazione di 1 micromole di substrato al minuto.*
3. *Il risultato del test della fosfatasi alcalina è considerato negativo se l'attività misurata nel latte vaccino non è superiore a 350 mU/l.*
4. *L'impiego di metodi analitici alternativi è accettabile qualora i metodi siano convalidati in base al metodo di riferimento ISO 11816:1 conformemente ai protocolli approvati a livello internazionale.*

Il laboratorio Nazionale di Riferimento per il latte e i prodotti a base di latte dell'ISS, di concerto con il Centro di Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino dell'IZSLER, ha organizzato nel 2014 una prova valutativa interlaboratorio (PVI) riservata ai laboratori coinvolti nel controllo ufficiale (IIZZSS) per valutare la loro performance nella determinazione della attività della fosfatasi alcalina nel latte vaccino con il metodo prescritto per il controllo ufficiale: ISO 11816:1. Di conseguenza, il numero degli IIZZSS partecipanti è stato condizionato dalla disponibilità dello strumento Fluorophos Test System (Advanced Instruments, Norwood, Us.) e dalla possibilità di eseguire la prova con il metodo ISO 11816:1.

Si è potuto così coinvolgere nelle attività sul latte organizzate a livello nazionale dal LNR-latte e dal CRN-Qualità latte bovino, anche laboratori esterni al circuito degli IIZZSS, come attuato fruttuosamente per il progetto “Aggiornamento dell'equazione di conversione per la determinazione della carica batterica nel latte tramite apparecchiature automatiche operanti in citometria di flusso” (2012) .

E' stato possibile mettere a punto e garantire la distribuzione di campioni con caratteristiche di omogeneità e stabilità rispondenti ai criteri definiti in ISO 13528:2005, nonché definire i valori assegnati dei campioni utilizzati e le relative incertezze. L'organizzazione della prova è stata quindi anche un'occasione di confronto con il Laboratorio Comunitario di Riferimento per il latte e i prodotti a base di latte (EURL-MMP : European Union Reference Laboratory for Milk and Milk Products) dell'ANSES di Maisons Alfort nell'ottica della standardizzazione dei campioni per i circuiti interlaboratorio.



Al seguito di questo primo circuito organizzato a livello nazionale è intenzione degli organizzatori proseguire con una serie di attività che considerino anche le performances dei laboratori che utilizzano metodi alternativi considerati accettabili dal Reg. 1664/2006 .

Aldilà degli esiti tecnico-statistici, si ritiene che il principale valore aggiunto della iniziativa vada indentificato nell'aver aperto un'attività coordinata e condivisa anche per il metodo fluorimetrico per la determinazione dell'attività fosfatasica nel latte che, pur essendo un'attività analitica diffusa e di rilevanza sia sanitaria che tecnologica, a differenza degli altri tradizionalmente determinati sul latte, non disponeva di un circuito interlaboratorio nazionale.

Questa iniziativa pone quindi anche l'Italia sul percorso tracciato dall' EURL-MMP per una maggior standardizzazione della metodica di riferimento che si estenderà nel prossimo futuro anche ad altre matrici del settore lattiero caseario.

Il Responsabile LNR latte e prodotti a base di latte

Dott.ssa Anna Maria Ferrini  
Dip Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare  
ISS - Roma

Il Dirigente Responsabile

Dr. Giuseppe Bolzoni  
CRN per la qualità del latte bovino  
IZSLER - Brescia

## INFORMAZIONI GENERALI

### Laboratori partecipanti

La prova ha coinvolto 19 laboratori, due dei quali non hanno eseguito le prove per indisponibilità momentanea dello strumento ed uno ha ritardato l'invio dei risultati oltre i tempi utili per l'elaborazione statistica (Tabella 1).

**Tabella 1:** Laboratori partecipanti

Laboratorio	Paese	Accreditamento
EURL M-MP A.N.S.E.S	Maisons Alfort (F)	X
Associazione Allevatori del Friuli Venezia Giulia	Codroipo (UD)	X
Associazione Regionale Allevatori Lombardia	Crema (CR)	
Bio-Lat S.n.c.	Lusciano (CE)	X
Caseificio Sociale di Manciano S.c.a.	Manciano (GR)	
CASTALAB di Bussolati & Miti	Fidenza (PR)	X
Centrale del latte di Firenze Pistoia Livorno S.p.a.	Firenze (FI)	
CHELAB - SILLIKER S.r.l.	Resana (TV)	
ECO-LAT S.r.l.	Lodi (LO)	X
EPTA-NORD S.r.l.	Conselve (PD)	
Francia Latticini S.p.a.	Sonnino (LT)	
I.Z.S. Lazio Toscana	Roma (RM)	X
I.Z.S. Lombardia Emilia Romagna - CRNQLB	Brescia (BS)	X
I.Z.S. Piemonte Liguria Valle d'Aosta	Torino (TO)	X
Latteria Soresina S.c.a.	Peschiera Borromeo (MI)	
Marino S.r.l.	Santa Maria a Vico (CE)	X
Trentingrana - CONCAST S.c.a.	Trento (TN)	X
Università degli Studi di Milano - DEFENS	Milano (MI)	
Veneto Agricoltura	Thiene (VI)	X

### Organizzazione della prova

I laboratori dotati della strumentazione adeguata (Fluorophos® Test System, Advanced Instruments, Norwood, US) hanno ricevuto via mail l'invito a partecipare alla prova valutativa interlaboratorio per la determinazione della attività della fosfatasi alcalina nel latte con metodo fluorimetrico e sono stati informati in merito agli aspetti organizzativi. Ai laboratori aderenti sono stati consegnati:

- “ricevuta di ritorno” da compilare all'arrivo del materiale
- “protocollo operativo” con le modalità d'esecuzione del test
- “scheda risultati” da compilare con i dati ricavati dalle analisi

La spedizione dei campioni è avvenuta nella prima quindicina di Luglio 2014. Tutti i laboratori partecipanti hanno ricevuto i campioni gratuitamente.

L'esecuzione delle prove è stata prevista entro il 30 luglio 2014 (non è stata indicata una data precisa in considerazione dello stato liofilizzato dei campioni da analizzare).

### **MATERIALE**

Ogni laboratorio ha ricevuto 4 flaconi destinati ad essere analizzati in triplice replica a partire dal prelievo e identificati con numeri casuali:

- 1 Campione “60” → latte vaccino parzialmente scremato pastorizzato liofilizzato
- 1 Campione “600” → latte vaccino parzialmente scremato termizzato liofilizzato
- 2 Campioni “6000” ( A e B) → latte vaccino parzialmente scremato non trattato termicamente liofilizzato (il latte crudo è stato diluito 1:100 con latte “ALP free” per ottenere materiale pronto all'uso)

E' stato inoltre inviato 1 flacone di latte vaccino parzialmente scremato liofilizzato “ALP free” per la calibrazione dello strumento, identificato con la dicitura “calibrator”.

Come indicato nel protocollo operativo, tutti i flaconi dovevano essere ricostituiti con 2,00 g di acqua demineralizzata pesati con bilancia tecnica, energicamente miscelati (eventualmente con vortex) fino a completo scioglimento e analizzati subito dopo la ricostituzione.

I controlli di funzionalità richiesti ai laboratori partecipanti prevedevano la registrazione di:

- Daily A/D Test ( $302 \pm 4$ ;  $602 \pm 12$ )
- Reagent Control ( $< 1200$ )
- Calibration Ratio
- Phosphacheck Controls (facoltativo): Neg  $< 10$ ; Normal  $< 40$ ; Pos  $500 \pm 100$  mU/L)

### Omogeneità e stabilità del materiale

La valutazione dell'omogeneità è stata eseguita preliminarmente alla prova interlaboratorio secondo quanto previsto dalla normativa ISO guide 35 (Reference materials — General and statistical principles for certification) e, limitatamente al campione “6000”, utilizzando i risultati della prova interlaboratorio sui due flaconi del campione “6000”.

Per la prova di omogeneità preliminare alla prova interlaboratorio sono stati selezionati in modo casuale il 5% dei campioni prodotti per ciascun livello di fosfatasi alcalina ed analizzati in duplice replica a partire dal prelievo.

Lo scarto tipo fra flaconi  $S_{bb}$  (ottenuto con analisi ANOVA) è quantificabile in 2,20 mU/L per il campione “60”, 14,78 mU/L per il campione “600”, 173,37 mU/L per il campione 6000, il quale è stato valutato anche all'interno della prova interlaboratorio con  $S_{bb}$  quantificabile in 95 mU/L. Il livello di omogeneità osservato è ritenuto conforme per le finalità d'uso, secondo il criterio definito in ISO 13528:2005 B.2.

**Nota:** il valore di omogeneità caratterizzante il singolo livello di determinazione è stato utilizzato successivamente per valutazione dell'incertezza di misura attesa nei prodotti utilizzati.

In considerazione della tipologia di prodotto (latte liofilizzato), le prove di stabilità sono attualmente in corso in quanto indirizzate a valutazioni a lungo termine (5-7 anni). Si è eseguita una prova a breve termine, nel periodo di tempo intercorrente tra i controlli sul lotto di produzione e l'esecuzione della prova (ISO 13528:2005 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons), selezionando in modo casuale 4 campioni per ciascun livello di fosfatasi alcalina e analizzandoli in duplice replica. I risultati hanno ovviamente fornito esiti abbondantemente entro i limiti previsti dalla Norma (tendenzialmente definiti per materiali ad elevata instabilità quali possono essere quelli destinati a prove di tipo microbiologico).

## **RISULTATI ED ELABORAZIONE**

### Riferimenti operativi

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

ISO 13528:2005,

ISO 11816-1:2013

ISO guide 35, 2006

ISO 5725-2:1994

Nel testo vengono riportati, quando opportuno, espliciti riferimenti.

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

### Raccolta Esiti Analitici

- 14 laboratori hanno rispettato le indicazioni operative fornite
- Un laboratorio (12) ha inviato i risultati con forte ritardo ed in modo incompleto per quanto riguarda gli aspetti relativi al controllo di funzionalità dello strumento (i risultati forniti pur se inseriti nella Tabella riepilogativa 5, non sono stati considerati nelle successive valutazioni statistiche)
- Un laboratorio (13) non ha eseguito le prove per indisponibilità prolungata dello strumento
- 2 laboratori non hanno comunicato i dati relativi al set up dello strumento; uno di essi non ha ne indicato il valore del *calibration ratio* ( comunque mantenuti nell'elaborazione finale)
- 1 laboratorio ha dichiarato difficoltà nello scioglimento di 2 campioni dichiarando presenza di materiale particolato in sospensione
- Nessuno ha presentato osservazioni in merito al processo di trasporto/ricezione del materiale.

### ELABORAZIONE ESITI ANALITICI

I risultati della prova sono riepilogati in tabella 2. Il calcolo dei valori attesi ad ogni livello di fosfatasi alcalina è avvenuto mediante stima robusta, secondo quanto indicato dalla normativa ISO 13528:2005 5.6.1 e 5.6.2.

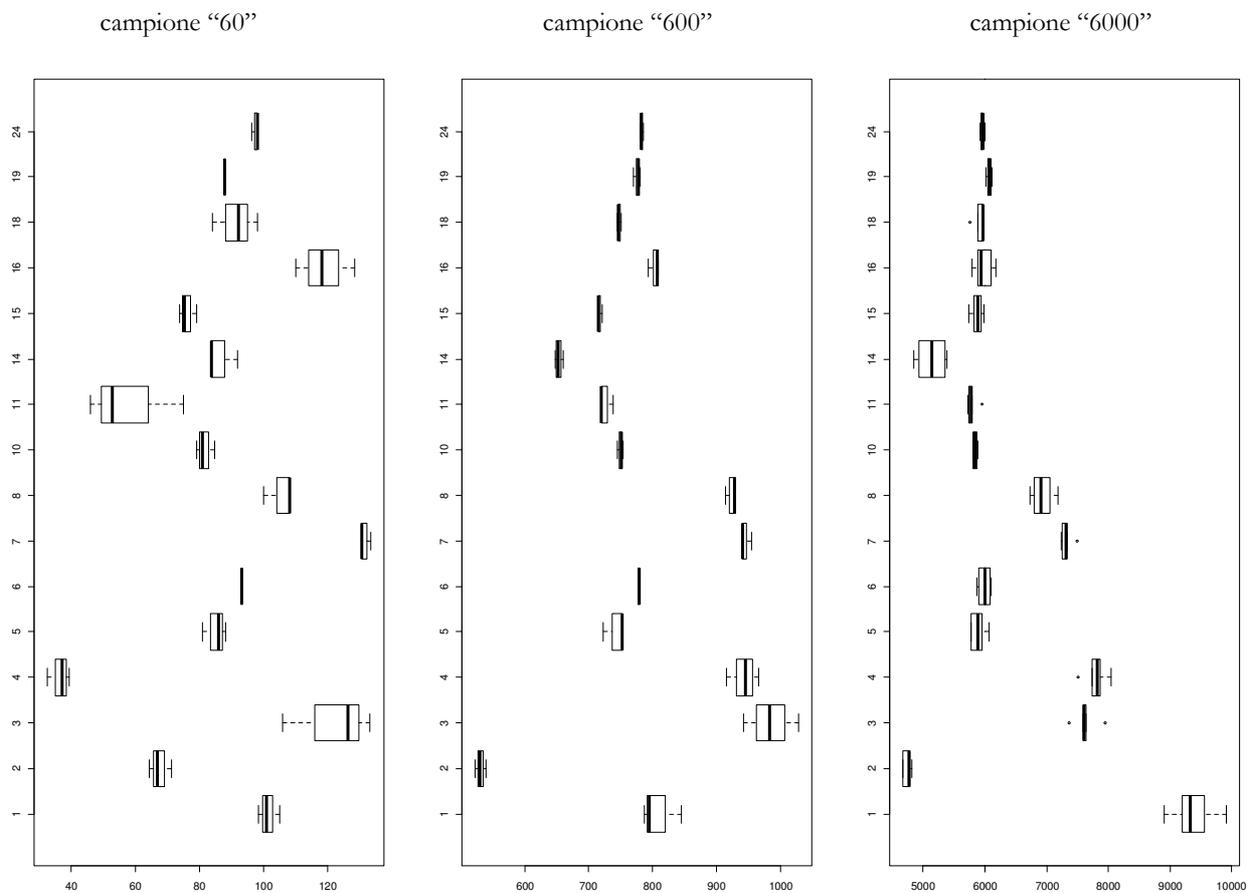
**Tabella 2:** Risultati della prova (valori espressi in mU/L)

CODICE LAB.	Campione 60			Campione 600			Campione 6000 A			Campione 6000 B		
	Rep. A	Rep. B	Rep. C	Rep. A	Rep. B	Rep. C	Rep. A	Rep. B	Rep. C	Rep. A	Rep. B	Rep. C
1	104,8	98,4	100,7	845,4	795,3	786,5	9361	9202	9285	9913	8915	9552
2	66,7	64,4	71,3	530	539,7	523,1	4735	4675	4675	4785	4808	4785
3	132,9	105,7	126,0	942,4	982,8	1027,9	7608	7599	7364	7617	7640	7948
4	39,5	32,6	37,2	965,4	945,6	914,8	7829	7861	7732	7511	7815	8040
5	81	86	88	752	723	752	5953	6059	5953	5811	5778	5769
6	93	93	93	779	777	779	6040	6105	6086	5953	5898	5866
7	133,3	130,6	130,6	954,3	939,6	939,6	7328	7231	7309	7498	7318	7249
8	108	108	100	913	930	928	6997	7185	7052	6836	6804	6730
10	80,9	79,1	84,6	754,4	750,7	745,2	5870	5820	5801	5811	5870	5880
11	52,9	74,9	46	719,4	739,2	719,4	5958	5778	5789	5737	5774	5732
14	83,7	83,7	91,9	647	653	661	5346	5241	5384	4850	4925	5038
15	79,1	73,6	75,4	720,8	715,3	715,3	5829	5939	5985	5930	5834	5737
16	118,1	128,3	109,9	793,4	809,5	807,7	5958	6100	6178	5893	5788	5921
18	84	98	92	745	747	751	5889	5760	5990	5958	5962	5962
19	87,8	87,8	87,8	780,1	778,3	770,5	6109	6063	6050	6017	6063	6096
24	96,1	97,9	97,9	784,7	781,0	782,9	5972	5939	5958	5999	5926	5976
12	96,2	81,3	83,1	642,8	567,6	633,9	4981	4540	4602	n.e.	n.e.	n.e.

n.e. = non eseguito

La valutazione complessiva della prova può essere fornita graficamente dal Grafico 1 in cui per ciascun laboratorio partecipante e per ciascun livello di fosfatasi alcalina sono osservabili la distribuzione dei risultati, la differenza tra repliche e il numero di eventuali osservazioni “anomale”.

**Grafico 1:** Box-plot complessivo della prova.



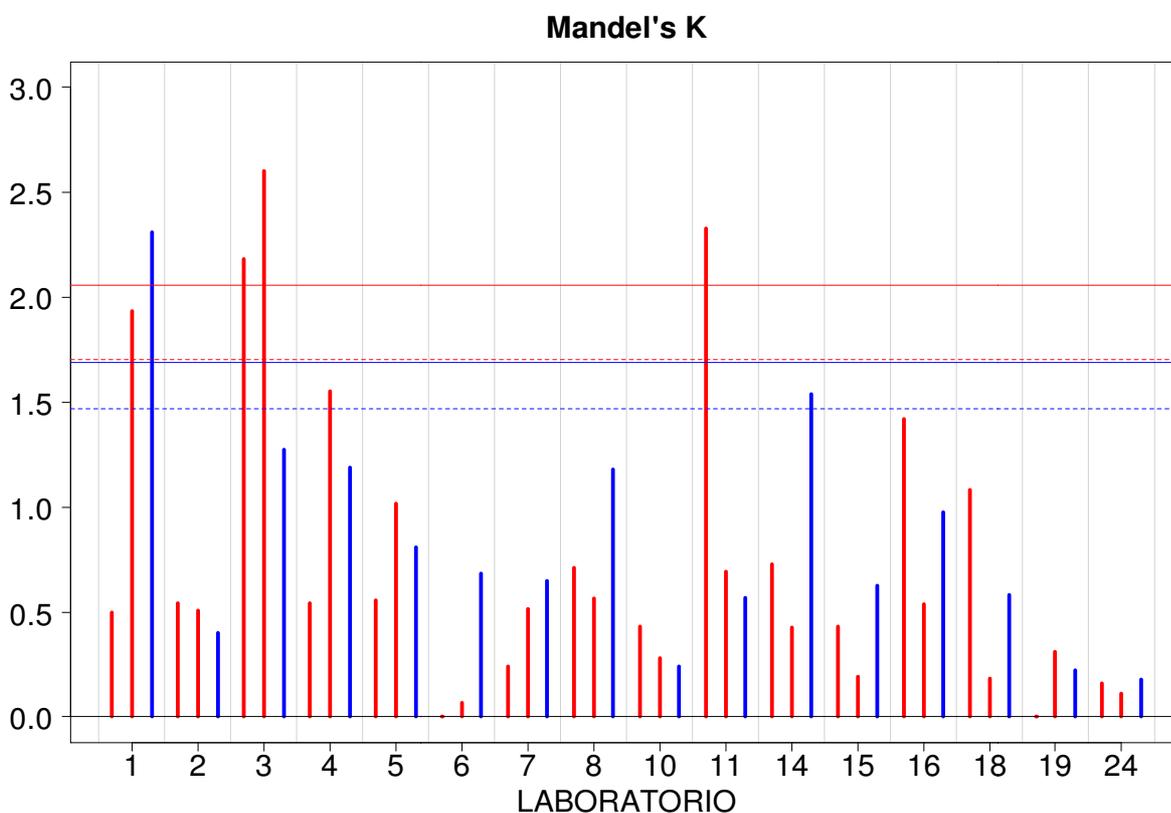
Un'ulteriore valutazione complessiva può essere ottenuta, per quanto riguarda la ripetibilità di misura, dalla statistica Mandel's K (Grafico 2), secondo le indicazioni di ISO 13528:2005 8.4. In blu è rappresentato il campione "6000" con 6 determinazioni (2 campioni in triplice replica), in rosso i campioni "60" e "600" con 3 determinazioni ciascuno. Le linee orizzontali rappresentano i limiti di scarto attesi, rispettivamente, con P=99% linea intera, P=95% linea tratteggiata.

Meritano segnalazione:

- Laboratorio 1: campione "600" e campione "6000"
- Laboratorio 3: campione "60" e campione "600"
- Laboratorio 11: campione "60"
- Laboratorio 14: campione "6000"

Da notare, inoltre, 2 indicatori estremamente bassi per il campione "60" nei laboratori 6 e 19, dovute a repliche numericamente identiche.

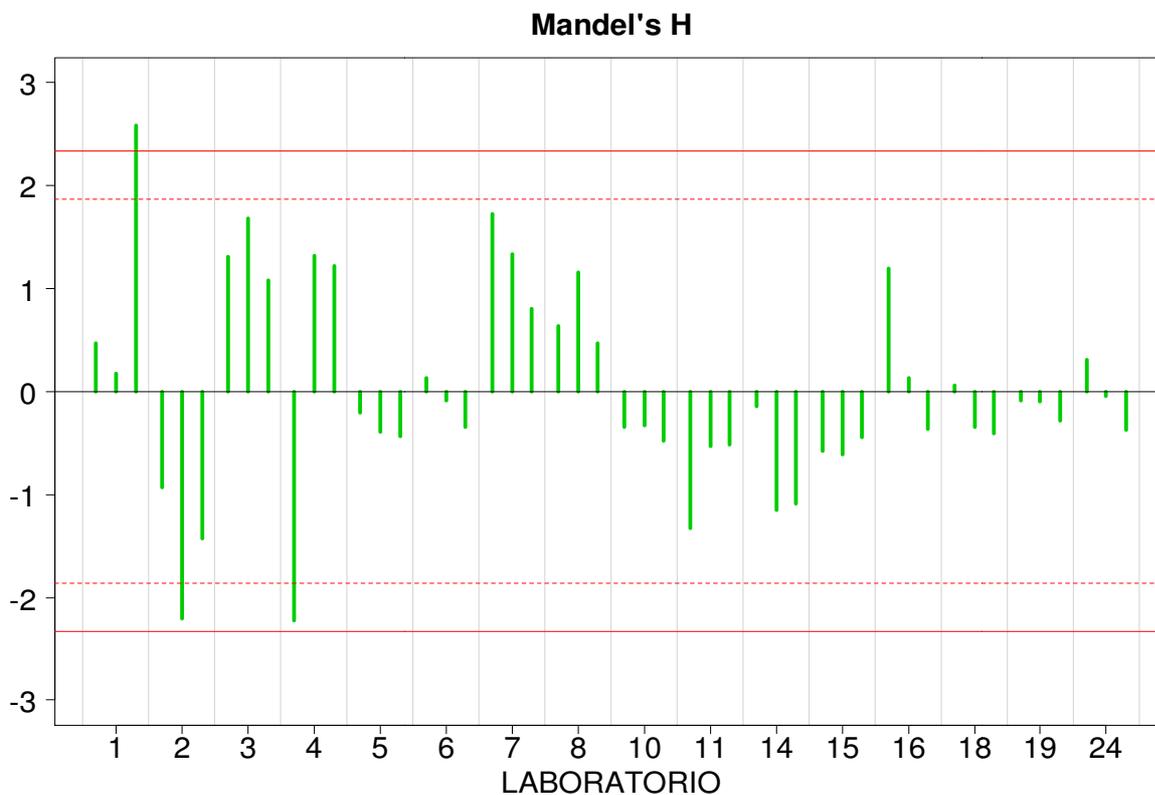
**Grafico 2:** Distribuzione delle misure di ripetibilità standardizzate (Mandel's K).



La dispersione tra laboratori può essere invece raffigurata (ISO 5275:2003) attraverso il parametro Mandel's H (Grafico 3), relativo alle medie di laboratorio per i tre campioni analizzati, anche in questo caso secondo limiti di significatività rispettivamente di : P=99% linea intera, P=95% linea tratteggiata. Si segnala:

- Laboratorio 1 per il valore medio sul campione "6000" ( P = 99%)
- Laboratori 2 e 4 rispettivamente per i campioni "600" e "60" ( P= 95%)

**Grafico 3:** distribuzione delle medie di laboratorio (Mandel's H)



Nota: è bene sottolineare che queste valutazioni statistiche forniscono un'analisi complessiva dell'andamento della prova confermando il livello di omogeneità dei campioni (Mandel's K) e di aggregazione degli esiti medi forniti dai partecipanti (Mandel's H), ma non equivalgono alla individuazioni di validi outliers. La tipologia di statistiche calcolate ed utilizzate di seguito per la valutazione delle performances (media robusta e scarto tipo robusto) non prevede infatti la selezione dei dati "validi" .

Ciò, del resto, si adatta alle finalità specifiche della presente prova che, essendo la prima realizzata a livello nazionale per questo metodo di prova ed avendo pertanto raggruppato Laboratori con

esperienze e competenze precedenti non del tutto uniformi, è da considerarsi come primo approccio conoscitivo all'argomento.

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

In carenza di criteri adattabili a tutti e tre i differenti livelli di fosfatasi alcalina dei campioni utilizzati nel Metodo di riferimento (ISO 11816-1:20136), per la determinazione dello scarto tipo  $\hat{\sigma}$  dalle osservazioni ottenute nella prova, si è scelto di definire la stima dello “scarto robusto” delle medie delle repliche di ciascun laboratorio, secondo le indicazioni di ISO 13528:2005 Punto 6.6.1.

valore scarto tipo assegnato per la prova:

$\hat{\sigma}$  campione “60”= 23,86 mU/L

$\hat{\sigma}$  campione “600”= 117,62 mU/L

$\hat{\sigma}$  campione “6000”= 1058,81 mU/L

Definizione del valore assegnato X e della sua incertezza

I valori attesi per ciascun livello di fosfatasi alcalina sono stimati come media robusta X in base alle indicazioni di ISO 13528:2005 C.1.

Per l'applicazione degli algoritmi di calcolo è stato utilizzato il software statistico R (pacchetto MetRology, funzione algA).

valore assegnato X:

X campione “60”= 90,77 mU/L

X campione “600”= 792,65 mU/L

X campione “6000”= 6297,20 mU/L

Di conseguenza è stata stimata l'incertezza tipo  $u_x$  dei valori assegnati :

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

Con:

$s^*$ = scarto tipo robusto delle medie di laboratorio (23,86 per il campione “60”, 117,62 per il campione “600”, 1058,81 per il campione “6000”).

$p = 16$ , n° di laboratori coinvolti nella stima.

Incetenza tipo  $u_x$ :

$u_x$  campione “60”= 7,46 mU/L

$u_x$  campione “600”= 36,76 mU/L

$u_x$  campione “6000”= 330,88 mU/L

Le incertezze tipo così stimate appaiono congrue rispetto al criterio definito in ISO 13528:2005 4.2

$$u_x \leq 0.3\hat{\sigma}$$

$$\text{campione } 60 \rightarrow 7,46 \leq 0.3 \times 23,86$$

$$\text{campione } 600 \rightarrow 36,76 \leq 0.3 \times 117,62$$

$$\text{campione } 6000 \rightarrow 330,88 \leq 0.3 \times 1058,81$$

L'incertezza di misura così ottenuta può pertanto essere considerata trascurabile nella calcolo dello Z-Score

#### Calcolo delle statistiche di performances

In funzione delle considerazioni precedenti, le prestazioni di laboratorio vengono valutate in termini di Z-score:

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

Dove  $x$  è la media di laboratorio per ciascun livello di fosfatasi alcalina ed  $X$  è la media robusta ottenuta nella prova

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 nelle tabelle 3, 4 e 5 ( la rappresentazione grafica degli stessi è fornita nei Grafici 4, 5 e 6)

**Tabella 3:** riepilogo statistiche della prova interlaboratorio campione “60”

laboratorio	media	n°dati	z – score
1	101,30	3	0,44
2	67,46	3	-0,97
3	121,53	3	1,28
4	36,43	3	-2,27
5	85,00	3	-0,24
6	93,00	3	0,09
7	131,50	3	1,70
8	105,33	3	0,61
10	81,53	3	-0,38
11	57,93	3	-1,37
14	86,43	3	-0,18
15	76,03	3	-0,61
16	118,76	3	1,17
18	91,33	3	0,02
19	87,80	3	-0,12
24	97,30	3	0,27

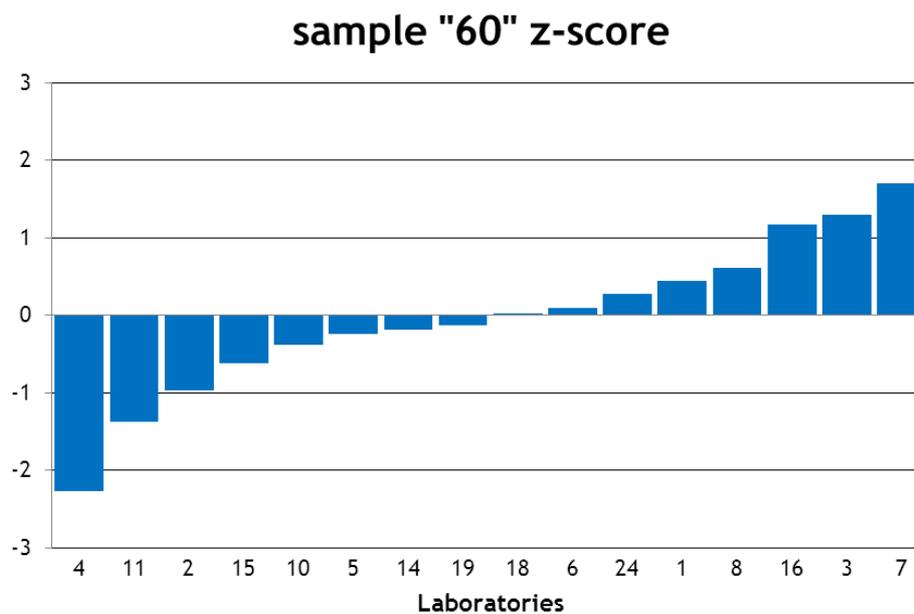
**Tabella 4:** riepilogo statistiche della prova interlaboratorio campione “600”

laboratorio	media	n°dati	z – score
1	809,06	3	0,13
2	530,93	3	-2,22
3	984,36	3	1,62
4	941,93	3	1,26
5	742,33	3	-0,42
6	778,33	3	-0,12
7	944,50	3	1,29
8	923,66	3	1,11
10	750,10	3	-0,36
11	726,00	3	-0,56
14	653,66	3	-1,18
15	717,13	3	-0,64
16	803,53	3	0,09
18	747,66	3	-0,38
19	776,30	3	-0,13
24	782,86	3	-0,08

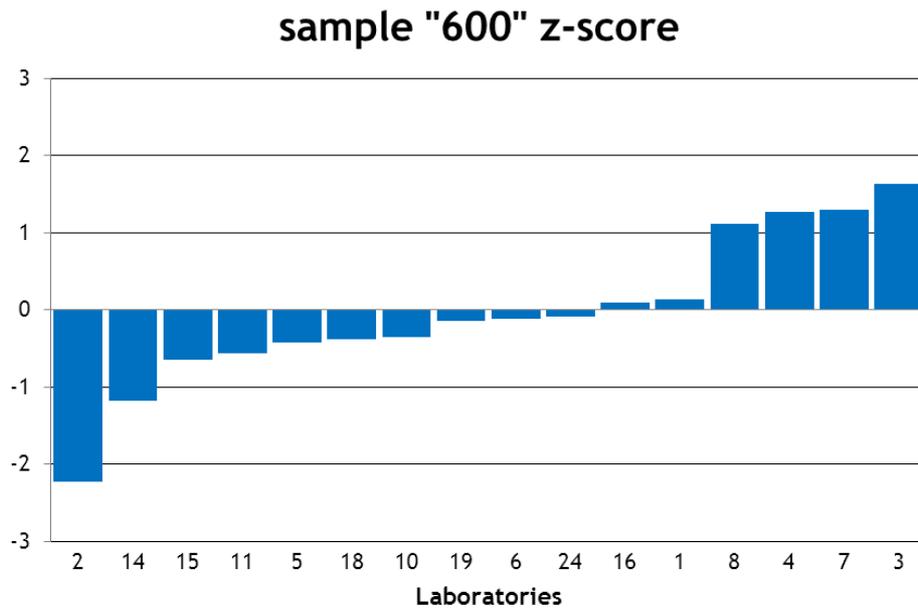
**Tabella 5:** riepilogo statistiche della prova interlaboratorio campione “6000”

laboratorio	media	n°dati	z – score
1	9371,28	6	2,90
2	4743,83	6	-1,46
3	7629,33	6	1,25
4	7798,00	6	1,41
5	5887,16	6	-0,38
6	5991,33	6	-0,28
7	7322,16	6	0,96
8	6934,00	6	0,60
10	5842,00	6	-0,42
11	5794,66	6	-0,47
14	5130,66	6	-1,10
15	5875,66	6	-0,39
16	5973,00	6	-0,30
18	5920,16	6	-0,35
19	6066,33	6	-0,21
24	5961,66	6	-0,31

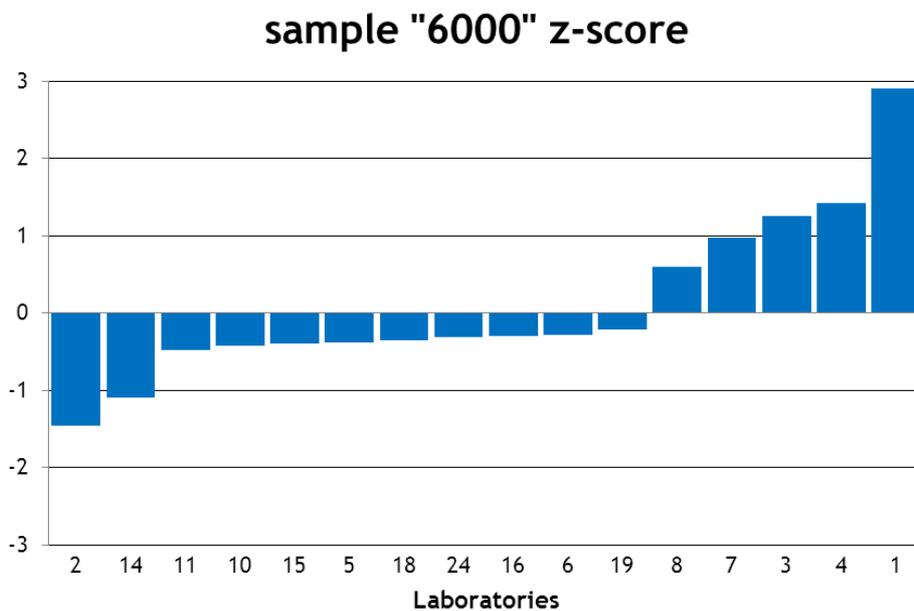
**Grafico 4:** distribuzione z-score campione “60”



**Grafico 5:** distribuzione z-score campione “600”



**Grafico 6:** distribuzione z-score campione “6000”





### Valutazione esiti della prova e conclusioni

Complessivamente l'esito della prova è considerato soddisfacente.

Per ogni livello di contaminazione sono disponibili i risultati di 16 laboratori e per ogni livello "solamente" 1 laboratorio su 16 ha riportato uno z score  $> 2$ : laboratorio 4 per il campione "60", laboratorio 2 per il campione "600", laboratorio 1 per il campione "6000".

Analizzando nello specifico le performances di questi laboratori (Tab. 3-5) è evidente comunque come per ognuno di questi, gli z-score delle altre due prove rientrino nella fascia di piena accettabilità.

L'analisi complessiva degli Z-score ottenuti, tenuto conto che tutti i laboratori hanno applicato lo stesso metodo, permette di osservare che un gruppo di laboratori maggioritario si raggruppa attorno a valori decisamente bassi e abbastanza omogenei. Aldilà quindi dei valori assoluti degli Z-score, che risentono ovviamente degli scostamenti dalla distribuzione normale e dall'entità degli scostamenti dei laboratori estremi, ciò ci permette di considerare con soddisfazione la situazione complessiva di uniformità dei laboratori coinvolti in questa prima esperienza. Al tempo stesso ciò costituisce un elemento di robustezza per le successive valutazioni che abbiamo dedicato alla definizione del titolo del materiale di riferimento testato nel corso della presente prova (vedi Allegato 1).

Ringraziamo tutti i laboratori che con la loro partecipazione ci hanno permesso di ottenere un quadro molto rappresentativo della realtà italiana nella realizzazione di questa prova.

Considerando l'importanza del significato della determinazione dell'attività della fosfatasi alcalina nel latte, riteniamo importante valutare prossimamente anche le performances dei laboratori che utilizzino per questo parametro metodi alternativi.

IL DIRIGENTE RESPONSABILE

Dr. G. Bolzoni

**FINE RAPPORTO**

## CONCLUSIONE AGGIUNTIVA

*Le analisi eseguite dai laboratori partecipanti sono state utilizzate anche per la determinazione del titolo del lotto sperimentale di materiale di riferimento in matrice liofilizzata che il Centro di Riferenza Qualità Latte Bovino dell'IZLSER di Brescia ha allestito nell'ambito di un progetto di Ricerca Corrente (007/2012 finanziato da Ministero della Salute). A scopo informativo, in Allegato 1, vengono illustrati alcuni dei punti fondamentali dell'elaborazione statistica realizzata. Nell'ultima Tabella è possibile verificare le differenze, in termini di valore medio e di incertezza di misura, risultanti da questo secondo step del lavoro svolto. Da ciò appare evidente che il contributo fornito attraverso la prova interlaboratorio realizzata è stato più che soddisfacente. E' comunque nelle nostre intenzioni sviluppare ulteriormente il processo di determinazione del titolo del materiale di riferimento prodotto (e di quelli attualmente in fase sperimentale in matrice panna, burro, formaggio) attraverso un allargamento della base di laboratori collaboratori. In quest'ottica, oltre ad auspicare il coinvolgimento di altri laboratori italiani per le attività future, sono stati avviati i contatti preliminari con il Laboratorio Comunitario di Riferimento dell'ANSES di Parigi (che ha preso parte alla presente prova) per coinvolgere nelle attività future anche altri laboratori di riferimento già esperti nella applicazione del metodo fluorimetrico e nelle attività interlaboratorio comunitarie.*



## ALLEGATO I

### SINTESI DELLE VALUTAZIONI CONDOTTE PER L'ASSEGNAZIONE DEL TITOLO AL MATERIALE DI RIFERIMENTO PRODOTTO

La procedura statistica applicata, oltre ai previsti controlli di stabilità ed omogeneità del lotto di materiale prodotto già descritti, ha previsto un approccio più selettivo in merito alla rilevazione degli "outliers" finalizzato, da una parte, a selezionare "dati più affidabili" e, dall'altra, a ridurre l'incertezza del titolo (ISO Guide 35).

A tale scopo sono stati applicati i test di Cochran e di Grubbs (Tabella 1).

**Tabella 1.** Dati outliers individuati mediante test di Cochran e di Grubbs (P 99%, P 95%)

Campione	Test di Cochran		Test di Grubbs	
	P 99%	P 95%	P 99%	P 95%
"60"	Lab. 3	Lab. 11		Lab. 4, 7
"600"	Lab. 3, 4	Lab. 1		
"6000"	Lab. 1	Lab. 14		

Successivamente sui dati così selezionati (eliminati i campioni outliers ed anche quelli definiti "straggled" compresi tra 95 e 99 %) è stata condotta l'analisi della varianza per caratterizzare i parametri di precisione sr, sL ed sR (Tabella 2).

**Tabella 2.** Stima delle componenti di dispersione (ANOVA)

Campione	N° Lab.	N° Osservazioni	Media	Deviazione Standard		
				sr	sL	sR
"60"	12	36	90,94	4,4	13,5	14,1
"600"	13	39	759,77	80	104,5	104,8
"6000"	14	84	6267,09	112,4	839,8	847,3



La stima finale dell'incertezza del prodotto è stata quindi condotta tenendo in considerazione anche l'incertezza ricavata dalla prova di omogeneità eseguita preliminarmente ed applicando il fattore di copertura 2 (Tabella 3).

**Tabella 3.** Stima dell'incertezza di misura (U)

Campione	N° Lab	N° Osservazioni	Val. Rif.	u char	u omog.	u char + u omog.	U (P95, K=2)	U%
60	12	36	90,94	3,95	2,196	4,52	9,04	9,9%
600	13	39	759,8	29	14,78	32,55	65,09	8,6%
6000	14	84	6267	224,8	173,4	283,9	567,74	9,1%

**Tabella 4.** Confronto tra risultati del PT e procedura di assegnazione del titolo (valore ed incertezza)

Assegnazione Titolo		Campione	Prova Interlaboratorio	
U	Valore assegnato		Valore assegnato	U
9,04	90,94	<b>60</b>	90,77	14,92
65,09	759,77	<b>600</b>	792,65	73,52
567,74	6267,09	<b>6000</b>	6297,20	661,76