



LA NOSTRA
ESPERIENZA,
LA VOSTRA
SICUREZZA.



Produzione e Validazione
Materiale di Riferimento
FOSFATASI ALCALINA in matrice latte

Roma, 1 aprile 2016



Attività del Centro di Referenza per la Qualità del Latte Bovino



- Dal 2000 produzione di materiale di riferimento per:
 - controllo interno delle attività analitiche su matrice latte
 - organizzazione di prove inter laboratorio
 - confronto tra metodiche diverse
- Materiale di Riferimento per:
 - Carica batterica totale
 - Cellule somatiche
 - Inibenti (penicilline, sulfamidici, tetracicline, ecc.)
 - Aflatossina m1
- Caratteristiche principali:
 - STABILITA' NEL TEMPO
 - FACILE CONSERVABILITA' E TRASPORTABILITA'



Materiale di Riferimento Fosfatasi Alcalina



Fluorophos[®] instrument

Controlli:

Daily A/D test

Reagent Control

Calibrator set

PhosphaCheck Controls (negative <10 mU/L,
normal < 40 mU/L, positive 500 ±100 mU/L)

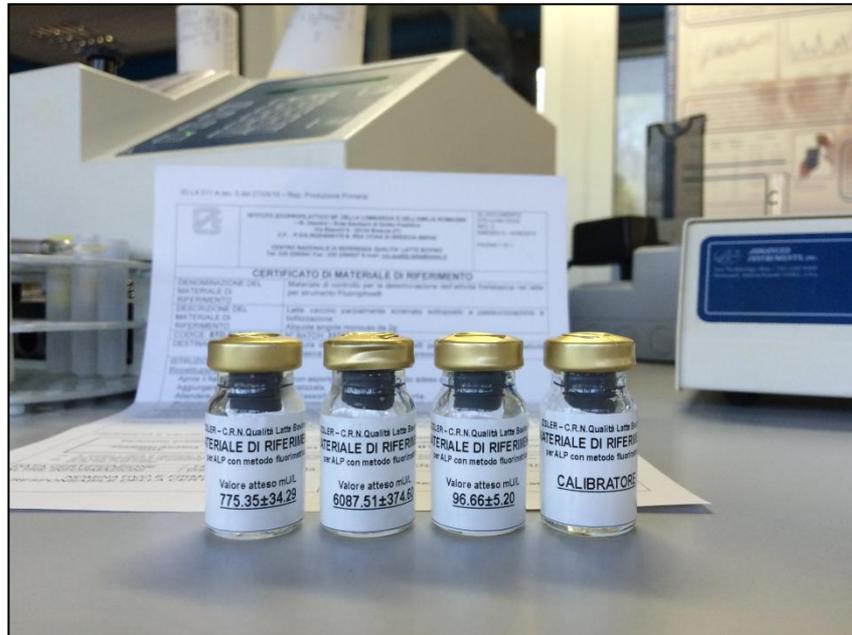
- ISO 11816-1 IDF 155-1

Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase activity

Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drink



Materiale di Riferimento Fosfatasi Alcalina



- Latte vaccino parzialmente scremato pastorizzato liofilizzato
- Latte vaccino parzialmente scremato termizzato liofilizzato
- Latte vaccino parzialmente scremato crudo liofilizzato
- Latte vaccino parzialmente scremato ALP free liofilizzato



Materiale di Riferimento Fosfatasi Alcalina



PRODUZIONE

- Latte vaccino crudo
- Controllo qualità: CBT, cellule somatiche, grasso, proteine, lattosio, inibenti e acidità
- Scrematura per centrifugazione
- Trattamento termico a bagnomaria





Materiale di Riferimento Fosfatasi Alcalina



PRODUZIONE

- Latte pastorizzato → 63° C per 30' → < 350 mU/L (come da Reg. CE 1664/2006)
- Latte termizzato → 63° C per ~15' → ~800 mU/L
- Latte crudo → dil. 1:100 con latte ALP free → < 7000 mU/L
- Latte ALP free → 95°C per 10' (ISO 11816-1)





Materiale di Riferimento Fosfatasi Alcalina



PRODUZIONE

- Stabilizzazione in acqua fredda
- Aliquotazione di 2 g in flaconi da 5 ml
- Liofilizzazione con Milk Technology Machine





GUIDE 35

Reference materials — General and statistical principles for certification

- Prova di omogeneità
- Prove di stabilità





GUIDE 35

Reference materials — General and statistical principles for certification

Prova di omogeneità:

- 5% del totale dei campioni per ogni livello di fosfatasi
- Scelti in modo casuale
- Analisi in doppia replica, in condizioni di ripetibilità
- Metodo descritto in ISO 11816-1





GUIDE 35

Reference materials — General and statistical principles for certification

ANOVA	Pastorizzato		Termizzato		Crudo	
Valore di Significatività	0.018		0.00015		9,15019E-09	
	mU/L	%	mU/L	%	mU/L	%
Scarto Tipo Flaconi (Sbb)	2.19	2.3	14.77	1.9	173.37	2.9
Scarto Tipo Ripetibilità (Sr)	2.37	2.5	9.94	1.3	64.40	1.1
Influenza Sr su Sbb	0.95	1.0	3.90	0.5	25.00	0.4

Prova di omogeneità





GUIDE 35

Reference materials — General and statistical principles for certification

Prove di Stabilità:

- Stabilità a lungo termine
- Stabilità a breve termine

- Stabilità secondo ISO 13528:2005





GUIDE 35

Reference materials — General and statistical principles for certification

Prova di Stabilità:

- Stabilità a lungo termine: «*stability of a property of a reference material under specified storage condition at the CRM-producer*»
- 4 campioni in duplice replica, ogni anno

...in corso...





GUIDE 35

Reference materials — General and statistical principles for certification

Prova di Stabilità:

- Stabilità a breve termine: *«stability of a property of a reference material during transport under specified transport condition»*

5 campioni, a 44°C per 1 settimana,
analizzati in duplice replica





Prova di Stabilità:

- Stabilità secondo ISO 13528:2005: *«allow a time delay between the homogeneity tests and the stability tests similar to the time delay that will be experienced by the samples tested by the participants in the proficiency test»*
- ~20 giorni dopo la prova di omogeneità
- 4 flaconi, 2 repliche

$$|\bar{x} - \bar{y}| \leq 0,3 \sigma$$

CAMPIONI	MEDIA OMOGENEITA'	MEDIA STABILITA'	DIFF. $ \bar{x} - \bar{y} $	σ	0,3 σ
PASTORIZZATO	96,64	96,28	0,36	23,86	7,15
TERMIZZATO	778,76	774,52	4,24	117,60	35,28
CRUDO	5973,7	5971,4	2,3	1059,00	317,70



Prova inter-laboratorio 1



1° PROVA INTER-LABORATORIO – Luglio 2014

- Organizzata da IZSLER e dall'Istituto Superiore di Sanità
- Contattati 48 laboratori italiani dotati dello strumento Fluorophos®
- Partecipanti: 18 laboratori italiani (pubblici e privati, di cui 11 accreditati)
+ lab. di riferimento ANSES
- 2 laboratori esclusi per invio dei risultati oltre la data fissata

- Ogni laboratorio ha ricevuto:
 - 1 campione latte pastorizzato
 - 1 campione latte termizzato
 - 2 campioni latte crudo
 - 1 campione ALP free

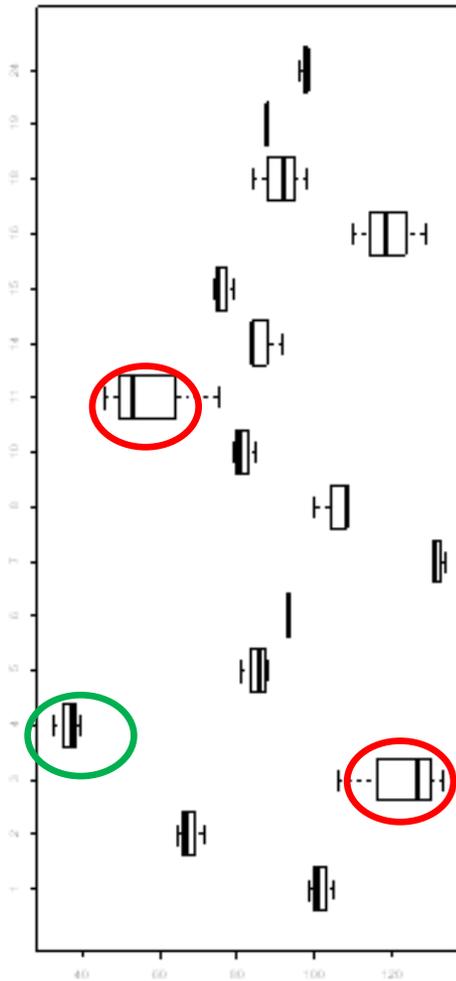
- Analisi secondo ISO 11816-1 in triplice replica



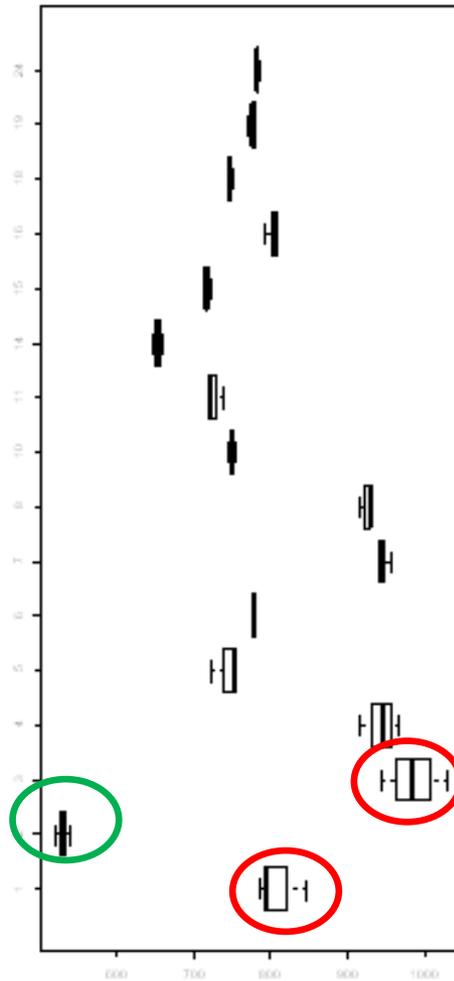
Prova inter-laboratorio 1



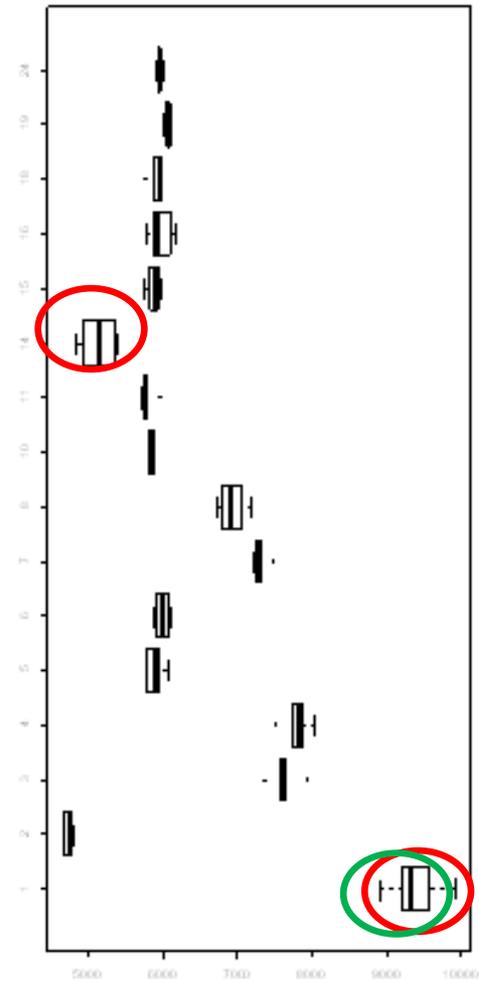
1° PROVA INTER-LABORATORIO – Box plot complessivo della prova



Latte pastorizzato



Latte termizzato



Latte crudo

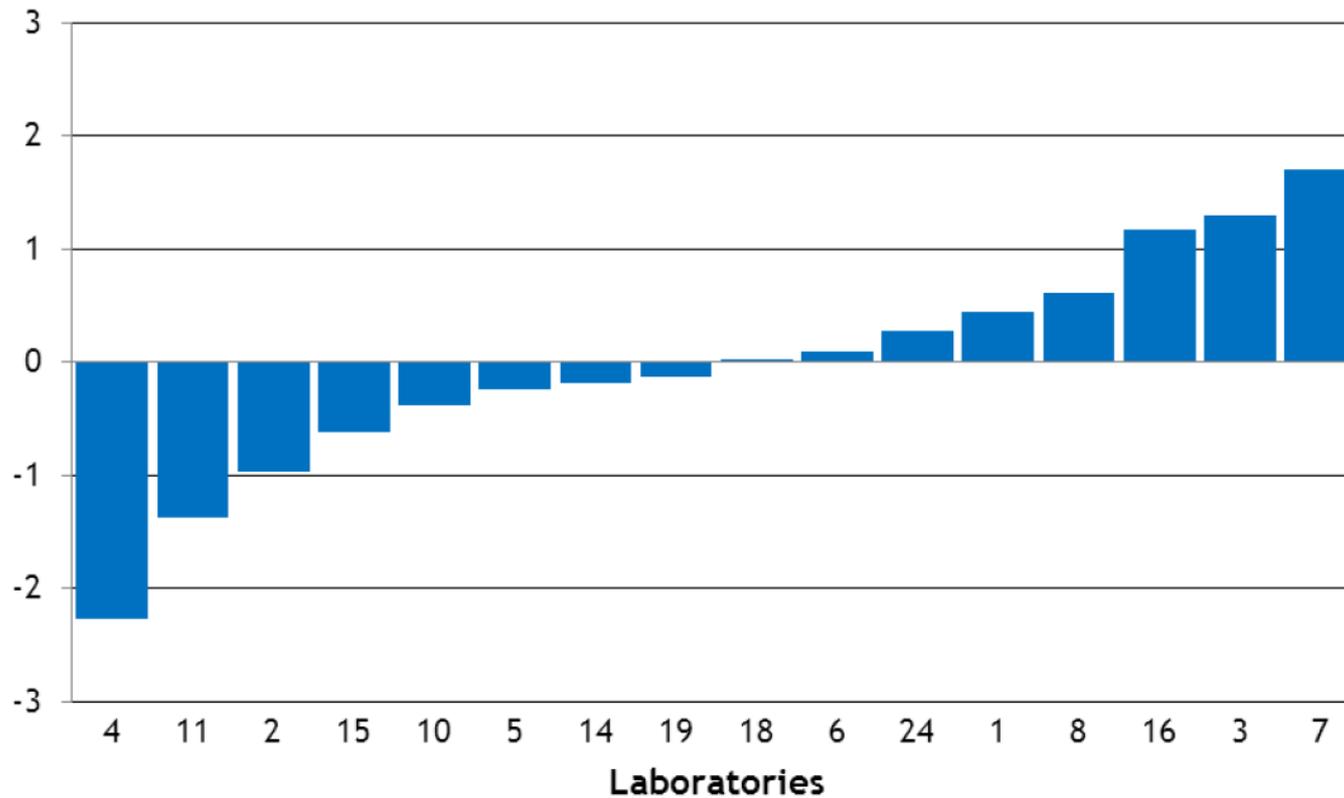


Prova inter-laboratorio 1



1° PROVA INTER-LABORATORIO: Z-score

Latte Pastorizzato



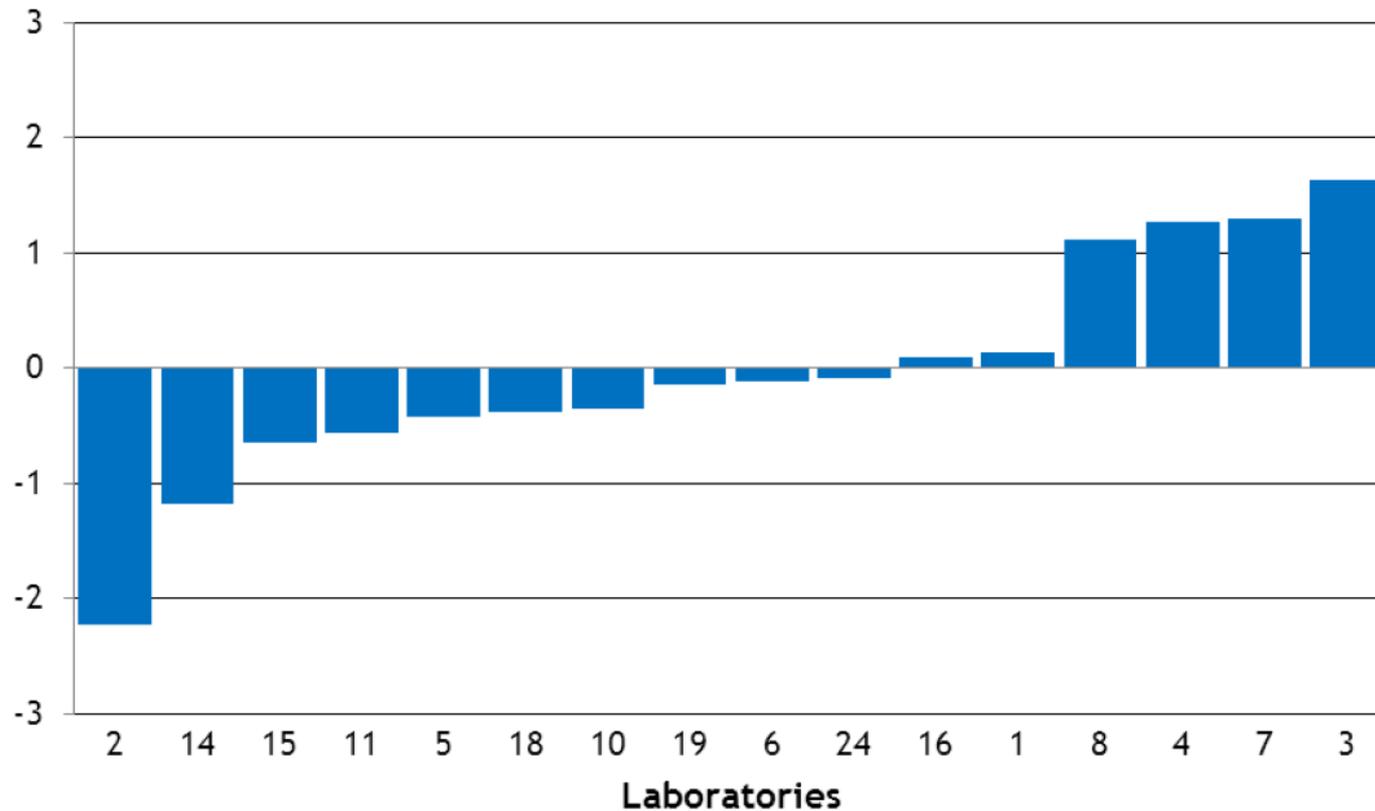


Prova inter-laboratorio 1



1° PROVA INTER-LABORATORIO: Z-score

Latte Termizzato



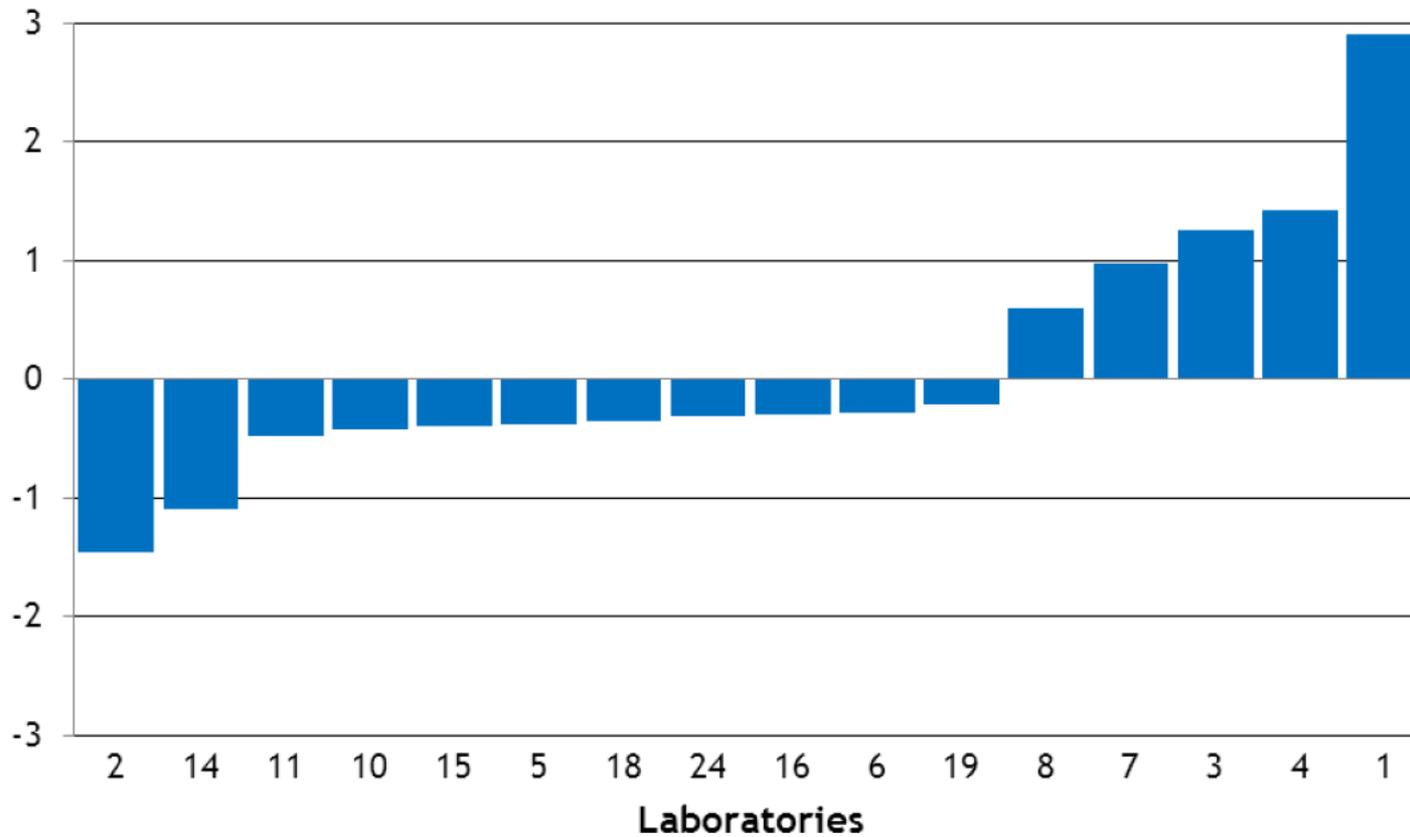


Prova inter-laboratorio 1



1° PROVA INTER-LABORATORIO: Z-score

Latte Crudo





Prova inter-laboratorio 1



1° PROVA INTER-LABORATORIO – Assegnazione titolo

- Selezione dei risultati secondo ISO Guide 35: individuazione degli outliers mediante test di Cochran e test di Grupps (software statistico R)
- Eliminazione degli outliers e anche degli straggled (osservazioni che risultano anomale al livello di significatività 95%, ma non al 99%)

CAMPIONE	Test di Cochran		Test di Grupps	
	P 99%	P 95%	P 99%	P 95%
PAST	Lab. 3	Lab. 11		Lab. 4, 7
TERM	Lab. 3, 4	Lab. 1		
CRUDO	Lab. 1	Lab. 14		



Prova inter-laboratorio 1



1° PROVA INTER-LABORATORIO – Assegnazione titolo

- Il valore di riferimento corrisponde alla media aritmetica delle osservazioni valide
- L'incertezza di misura è data dalla somma dell'incertezza di caratterizzazione con l'incertezza data dalla prova di omogeneità, moltiplicata per un fattore di copertura $K=2$ (P95%)

	N° Outliers + Stragglers	N° Osservazioni	Valore di Rif.	U (P95, K=2)	U%
PAST.	12	48	90.94	9.04	9.9
TERM.	9	48	759.77	65.09	8.6
CRUDO	12	96	6267.09	567.74	9.1

Dati presentati al «Meeting of National Reference laboratories», Ottobre 2014, Parigi



Prova inter-laboratorio 2



2° PROVA INTER-LABORATORIO – Luglio 2015

- 17 laboratori nazionali di riferimento
- Analisi in duplice replica di:
 - 1 flacone latte pastorizzato
 - 1 flacone latte termizzato
 - 1 flacone latte crudo
 - 1 flacone latte ALP Free
- **Inoltre:** 2 flaconi di matrici diverse (burro, panna o formaggio)

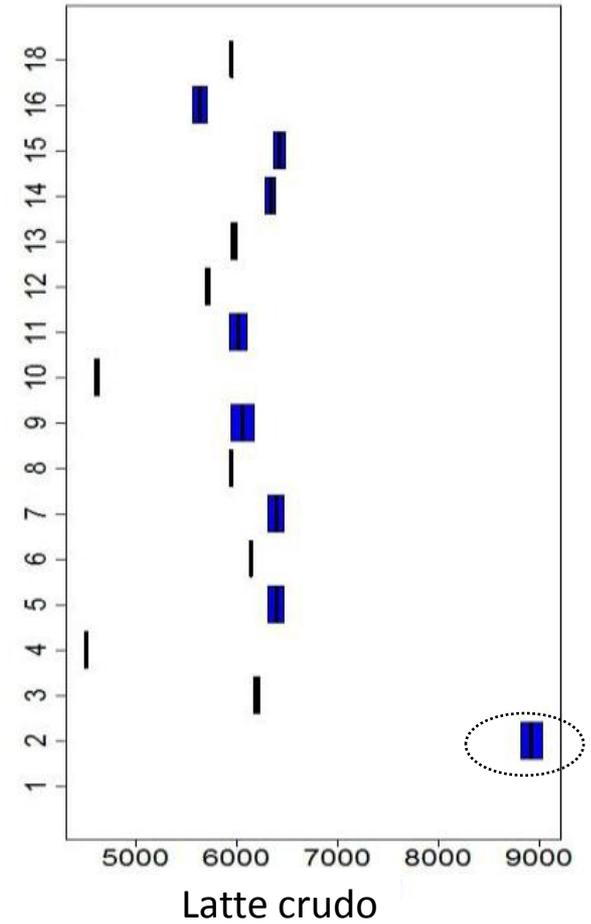
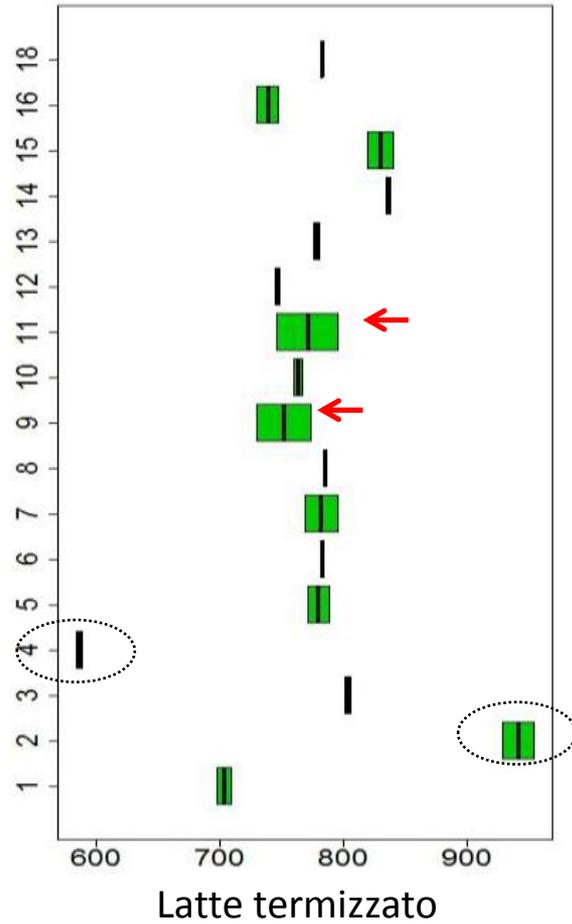
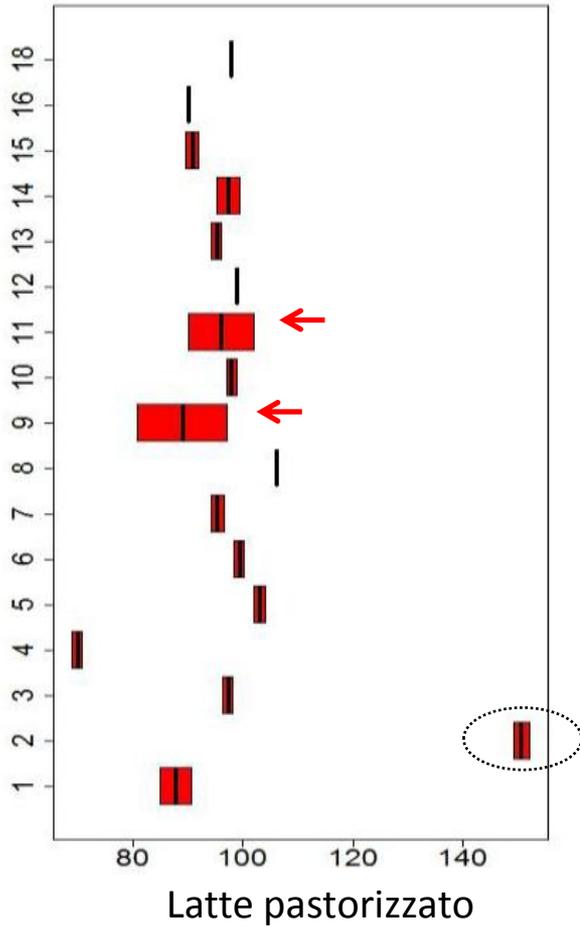




Prova inter-laboratorio 2



Box-plot samples

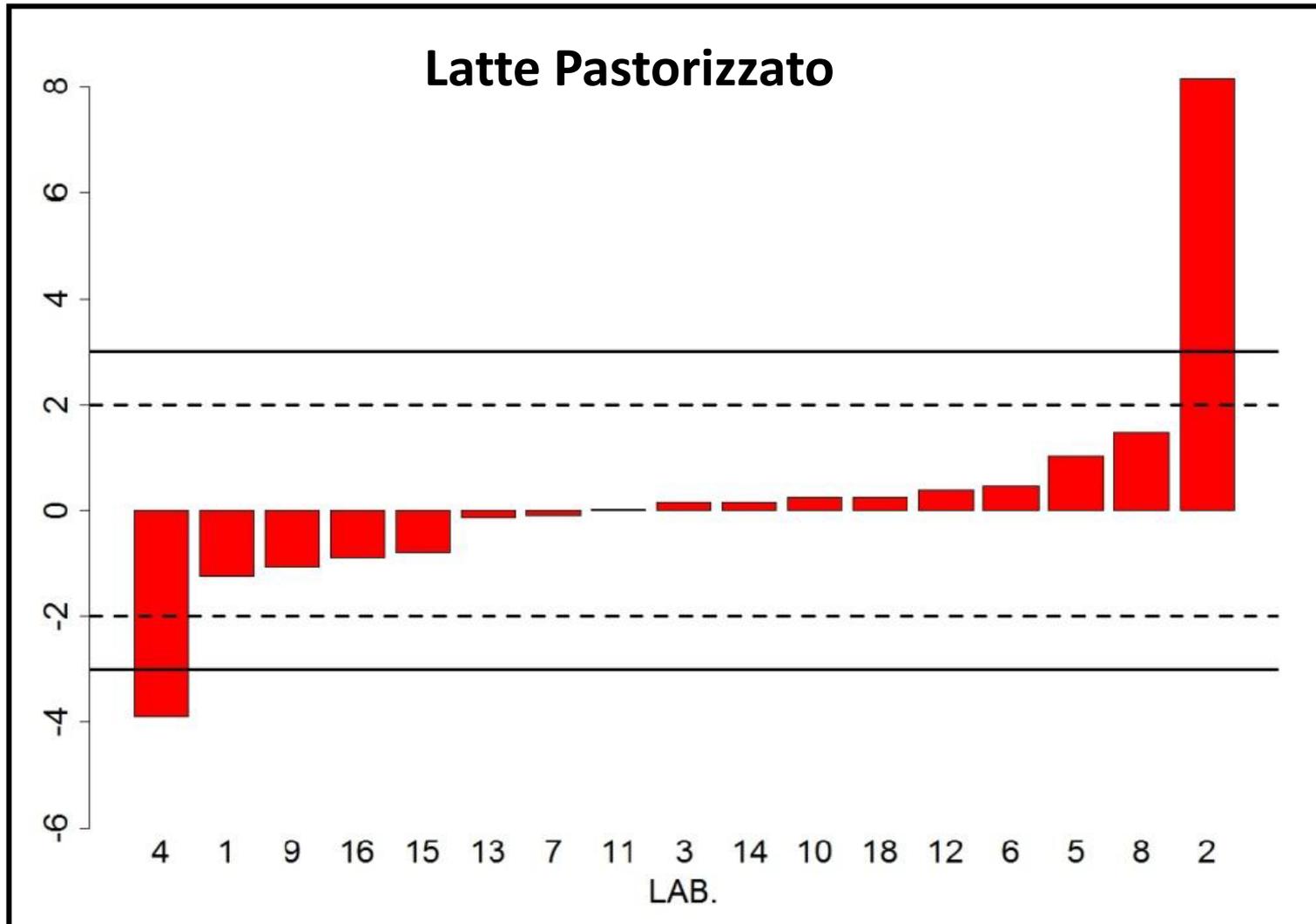




Prova inter-laboratorio 2

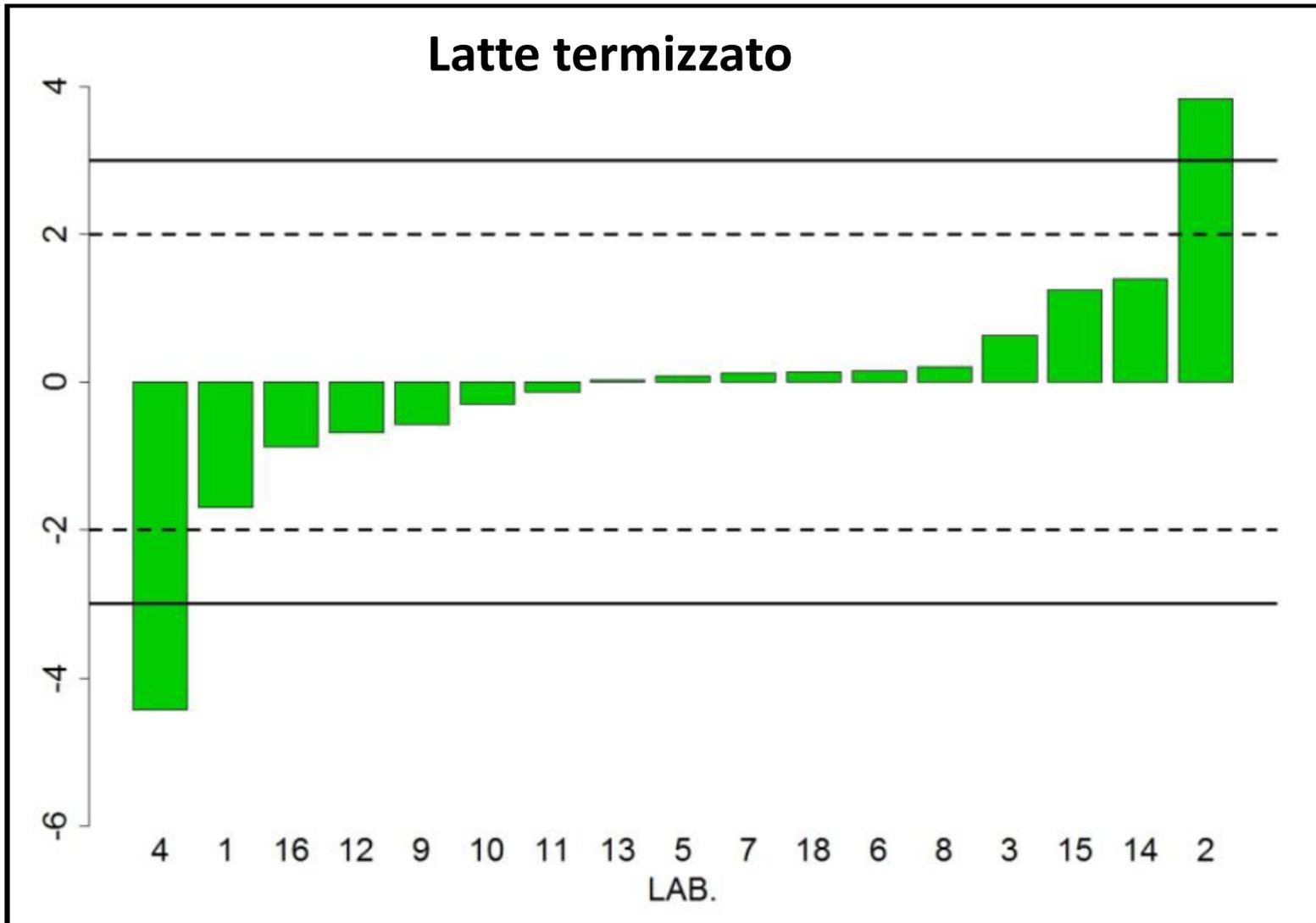


2° PROVA INTER-LABORATORIO – Z-score



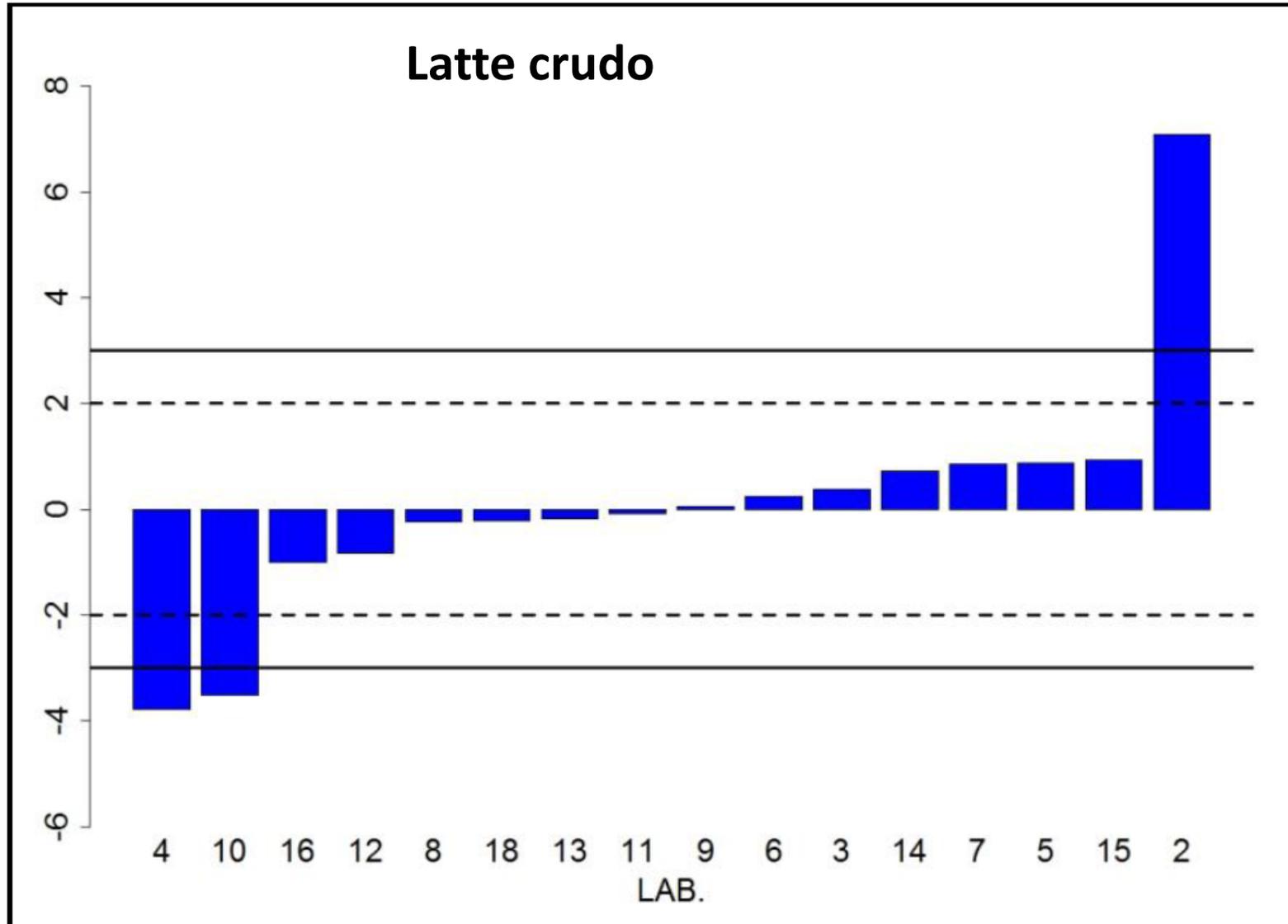


Prova inter-laboratorio 2





Prova inter-laboratorio 2





Prova inter-laboratorio 2



2° PROVA INTER-LABORATORIO – Assegnazione Titolo

- Selezione dei risultati secondo ISO Guide 35: individuazione degli outliers mediante test di Cochran e test di Grupp (software statistico R)
- Eliminazione degli outliers
- Definizione del valore di riferimento e relativa incertezza

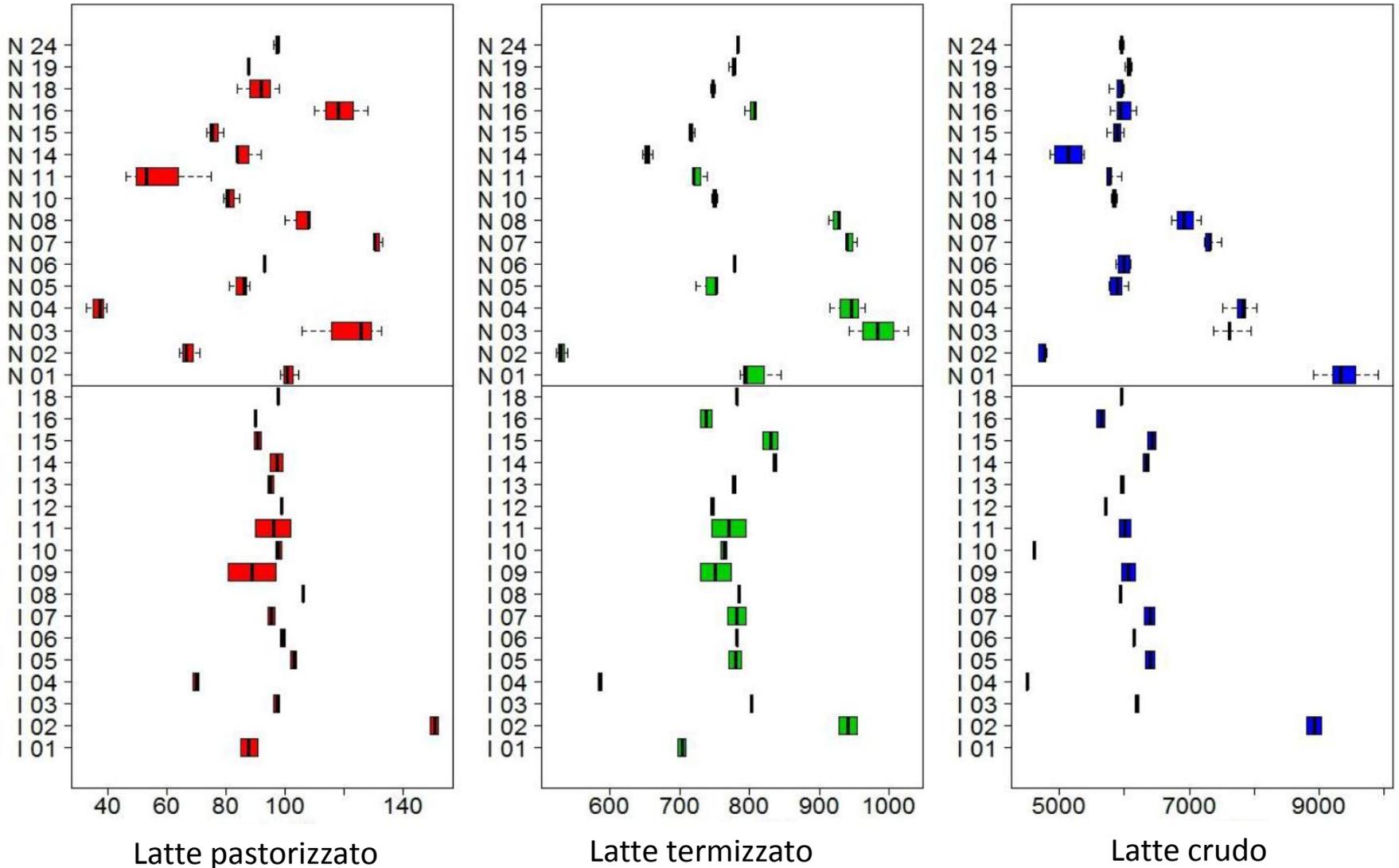
	N° outliers	N° osservazioni	Valore di rif.	U (P95, K=2)	U %
Past.	8	34	96.7	5.2	5.4
Term.	4	34	775.3	34.3	4.4
Crudo	6	32	6087.5	374.6	6.2



Confronto tra le 2 prove



Box-plot for 2014 and 2015 PT





Confronto tra le 2 prove



	Lab n.	Obs n.	Ref. Val.	charact. u	homog. u	u charact. + u homog.	Expanded U (P95, K=2)	U%
2014								
60	12	36	90.94	3.951	2.196	4.52	9.04	9.9%
600	13	39	759.77	29	14.78	32.55	65.09	8.6%
6000	14	84	6267.09	224.8	173.4	283.9	567.74	9.1%
2015								
60	13	26	96.66	1.39	2.20	2.60	5.20	5.4%
600	15	30	775.35	8.70	14.78	17.15	34.29	4.4%
6000	13	26	6087.51	70.88	173.37	187.30	374.60	6.2%



Altre matrici...



PROVA INTERLABORATORIO 2

2 flaconi di matrici diverse dal latte da analizzare in duplice replica

- Formaggio liofilizzato
- Panna liofilizzata
- Burro liofilizzato

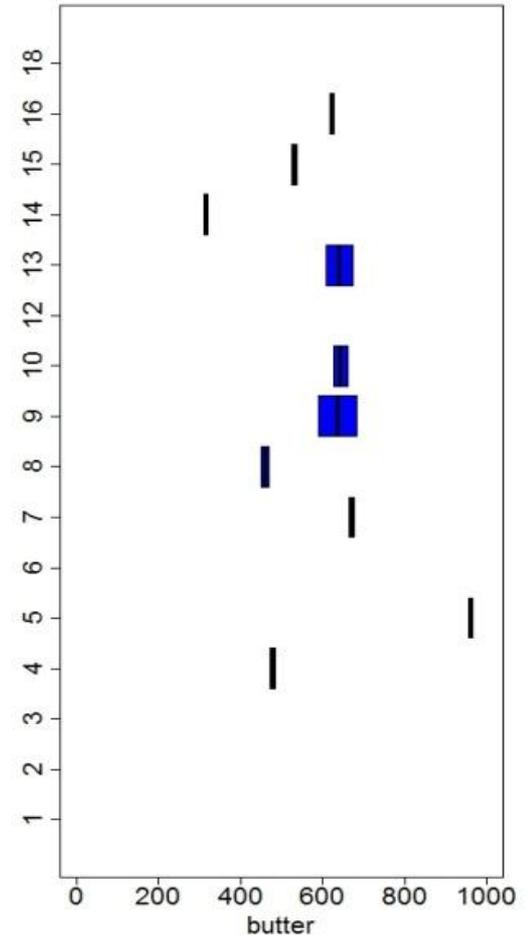
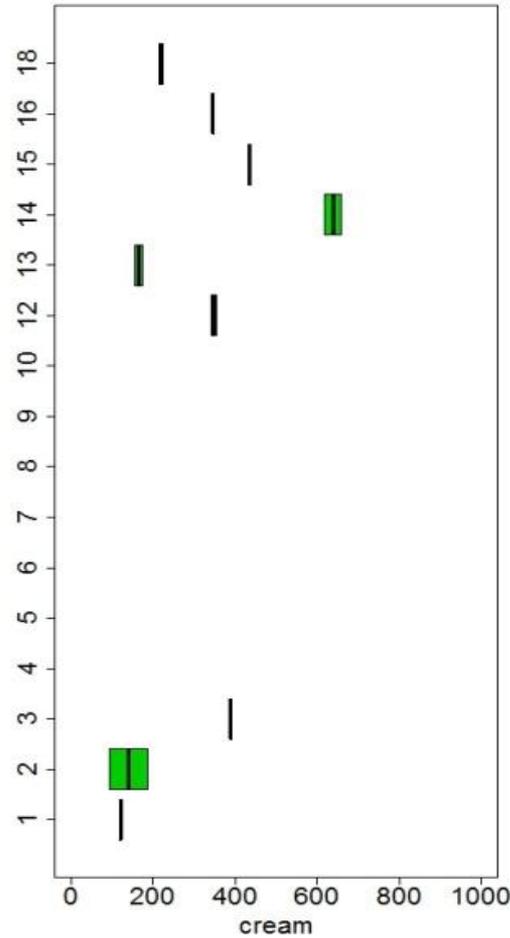
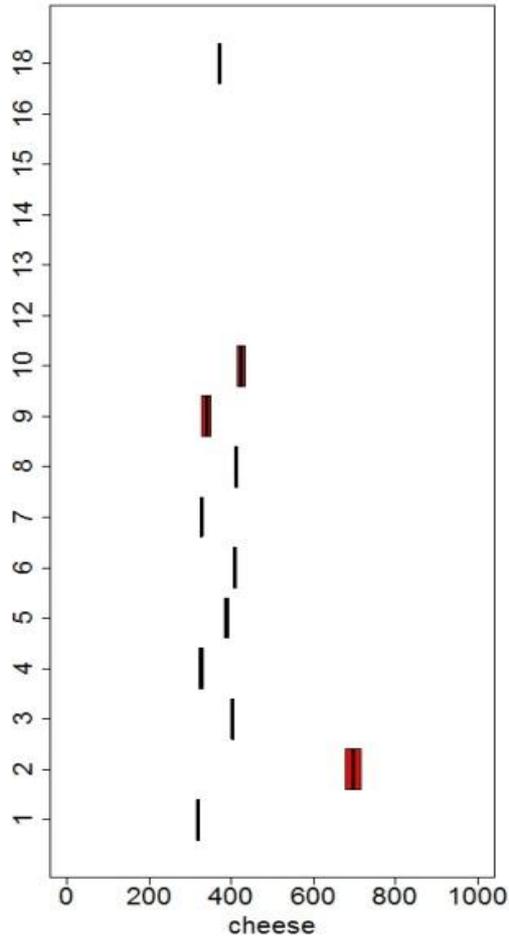




Altre matrici...

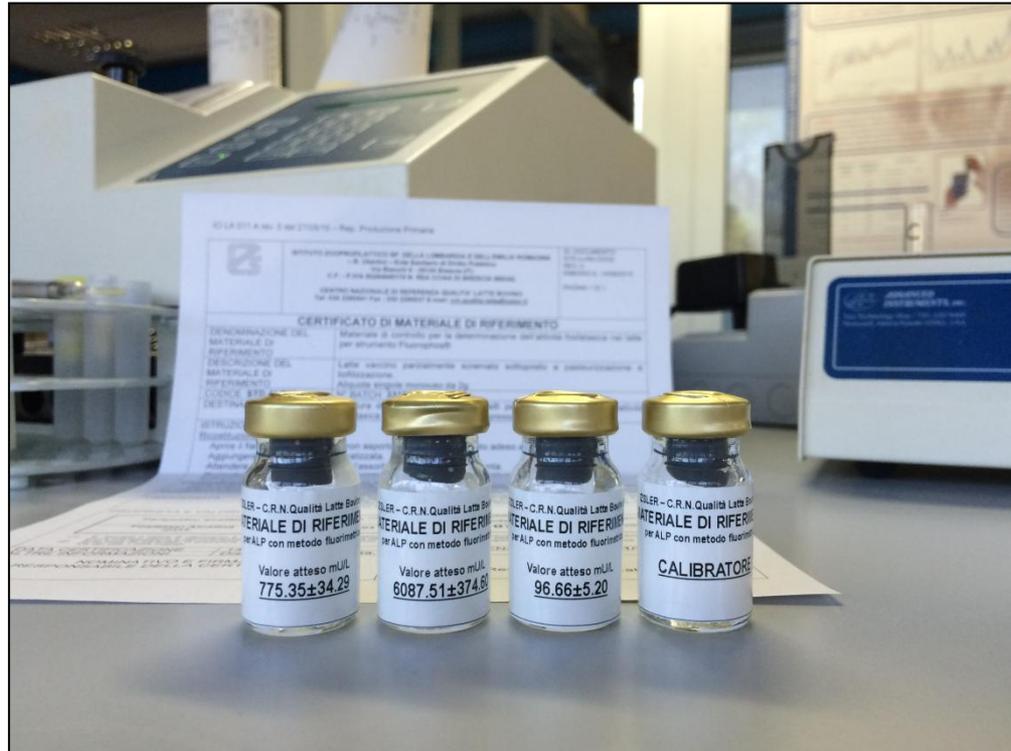


Box-plot samples (other matrices)





Conclusioni





GRAZIE PER L'ATTENZIONE