

ORGANIZZAZIONE DEL CIRCUITO INTERLABORATORIO AQUA

Schema di Microbiologia alimentare

Nome e indirizzo del provider e del coordinatore del "Circuito Interlaboratorio per l'assicurazione qualità dei risultati AQUA"	Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie Viale dell'Università 10 – 35020 LEGNARO Coordinatore Dr.ssa Maria Grimaldi Centro Servizi alla Produzione
Nome e recapiti del responsabile dello "Schema di Microbiologia alimentare"	Dr.ssa Maria Grimaldi Centro Servizi alla Produzione Tel. 049/8084306 e-mail: mgrimaldi@izsvenezie.it
Nome e recapiti dei responsabili tecnico e statistico dello "Schema di Microbiologia alimentare"	Responsabile tecnico: Dr.ssa Romina Trevisan Centro Servizi alla Produzione Tel. 049/8084152 e-mail: rtrevisan@izsvenezie.it Responsabile statistico: Dr.ssa Marzia Mancin Tel. 049/8084431 e-mail: mmancin@izsvenezie.it
Obiettivo e struttura dello schema	L'obiettivo del circuito è di offrire uno strumento per garantire l'assicurazione della qualità dei risultati in Microbiologia alimentare. Lo schema prevede circuiti interlaboratorio simultanei e continui che permettono un confronto dei laboratori tra loro.
Subappalto delle attività (Nome e recapiti ditta/laboratorio terzi)	Nessuna attività viene subappaltata a terzi.
Esperti tecnici esterni all'Organizzazione dello Schema	Nessuno.
Requisiti che permettano la partecipazione	Possono partecipare allo schema, laboratori di Microbiologia alimentare attrezzati per manipolare microrganismi del Gruppo di Rischio 2 secondo la classificazione stabilita dall'All. XLVI del D. Lgs. 09/04/2008, n° 81. Le iscrizioni avvengono on-line tramite il sito web dell'IZSVe. L'iscrizione consente l'accesso personalizzato (con utente e password) al gestionale Aquaweb.
Numero e tipologia di partecipanti attesi	I partecipanti attesi sono laboratori pubblici e privati che possono inviare i risultati di più operatori, in più repliche e con più metodiche. Per le prove qualitative non è necessario un numero minimo di partecipanti, per le prove quantitative sono necessari un numero sufficiente di risultati che può essere individuato in linea generale in 15 dati, da valutare comunque nel contesto generale della distribuzione dei dati. Se il numero dei laboratori iscritti ad un circuito è inferiore a 15, l'Organizzazione valuterà l'annullamento delle prove quantitative previste, prima dell'invio del circuito stesso. Se il numero dei laboratori iscritti ad un circuito è maggiore di 15 ma il numero di partecipanti è inferiore a 15, in una o più delle prove quantitative previste in quel circuito, l'Organizzazione valuterà l'annullamento della/delle prove quantitative stesse. In entrambi i casi il cliente verrà informato. Verrà valutato uno sconto sul costo del circuito in base ai vari casi che si

	dovessero presentare.
Normativa e legislazione di riferimento	<p>Per la gestione del Circuito Interlaboratorio:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ISO/IEC 17043:2010 • ISO/TS 22117:2010 • ISO 13528:2015 <p>Per le metodiche utilizzate per le analisi microbiologiche:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reg. 2073/2005 e successive modifiche • OM 07.12.93 G.U. 13.12.93 n. 291
Tipologie di campioni prova	<ul style="list-style-type: none"> • Campioni prova con matrice inclusa: campioni liofilizzati in flaconcini di vetro composti da matrice alimentare di diversa natura (es. latte, carne, molluschi bivalvi, vegetali) artificialmente o naturalmente contaminata. • Campioni prova con matrice da aggiungere: campioni liofilizzati in flaconcini di vetro contenenti solo i microrganismi target e non target, inviati con matrice alimentare da aggiungere.
Analisi previste e calendario di pianificazione degli invii dei CI	<p>Conta di:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Bacillus cereus</i> • <i>Campylobacter</i> spp. • <i>Clostridium perfringens</i> • Coliformi totali • Enterobatteri totali • <i>Escherichia coli</i> • <i>Escherichia coli</i> MPN • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Listeria monocytogenes</i> MPN • Microrganismi anaerobi solfito riduttori • Microrganismi mesofili • Stafilococchi coagulasi positivi <p>Ricerca di:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Campylobacter</i> spp. • <i>Cronobacter (Enterobacter) sakazakii</i> • Enterotossine stafilococciche • <i>Escherichia coli</i> O157 • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Salmonella</i> spp. • <i>Yersinia enterocolitica</i> <p>Ogni anno viene predisposto e pubblicato sul sito web, un calendario con le distribuzioni, le analisi e le matrici alimentari previste.</p>
Contenuto e preparazione dei campioni prova	<p>I campioni prova contengono generalmente microrganismi target e non target in modo tale da simulare i campioni di routine. I ceppi batterici utilizzati derivano da collezioni certificate (es. ATCC). Possono eventualmente essere utilizzati anche ceppi batterici di campo.</p> <p>Campione prova con matrice inclusa: i microrganismi contaminanti vengono fatti crescere in idoneo brodo di coltura e omogenati alla matrice alimentare diluita. La sospensione viene aliquotata in continua agitazione in flaconcini da 2 ml, successivamente congelati e liofilizzati.</p> <p>Campione prova con matrice da aggiungere: i microrganismi contaminanti dopo la crescita in idoneo brodo di coltura vengono addizionati con un crioprotettore, aliquotati, liofilizzati e confezionati insieme alla matrice alimentare prevista pre-pesata da aggiungere.</p>
Stoccaggio e distribuzione dei campioni prova	I campioni prova vengono stoccati tra +2°C e +8°C e trasportati a temperatura controllata:

	<ul style="list-style-type: none"> • per i laboratori periferici dell'IZSve tramite trasporto interno • per i partecipanti esterni tramite ditta autorizzata al trasporto di materiale biologico a temperatura controllata. <p>E' possibile anche il ritiro dei campioni prova a carico del cliente, direttamente presso il laboratorio di produzione del circuito AQUA.</p> <p>In caso di perdita o di danneggiamento dei campioni prova, l'organizzazione del circuito provvederà, a proprie spese, all'invio di un ulteriore campione prova.</p>
Numero di distribuzioni per anno per ogni tipologia di analisi sulla stessa matrice	Una.
Numero di campioni prova per distribuzione	Per la ricerca di <i>Salmonella</i> spp. e di <i>Listeria monocytogenes</i> vengono inviati 3 campioni prova per ognuna delle due analisi. Per tutte le altre prove qualitative vengono inviati due campioni prova. Per le prove quantitative viene inviato un unico campione prova.
Informazioni tecniche specifiche	<p>Le informazioni che accompagnano i campioni prova (pubblicate in Aquaweb con avviso al partecipante tramite e-mail) sono le seguenti:</p> <ul style="list-style-type: none"> • modalità di conservazione dei campioni prova fino all'inizio delle analisi • modalità di trattamento dei campioni prova (ai partecipanti viene suggerito, per la fase di allestimento analisi quantitative, un range di diluizioni da seminare). La risospensione dei campioni prova è un punto critico del processo, pertanto le istruzioni sono molto dettagliate • analisi da effettuare e procedure da utilizzare, che possono essere: <ul style="list-style-type: none"> ➢ metodi indicati dal circuito ➢ metodi di propria scelta (vedi note 1 e 2) • modalità di registrazione dei risultati tramite Aquaweb • date di inizio analisi (range di tre giorni) e data ultima di invio risposte • scheda di sicurezza <p>Nota 1: laddove esistano normative di legge (es. Reg. 2073:2005) che stabiliscano i metodi da applicare è consigliabile seguire quanto previsto dalle stesse.</p> <p>Nota 2: in base alla ISO/IEC 17043:2010 (p. 4.5), le metodiche quantitative utilizzate dai partecipanti vengono comparate per valutare la loro equivalenza tecnica. I risultati delle metodiche valutate non equivalenti vengono elaborati separatamente laddove la numerosità dei dati lo consente; se la numerosità non è sufficiente si riporta comunque una breve analisi statistica descrittiva.</p>
Controlli di qualità (prove di omogeneità e stabilità) eseguiti su ogni lotto di produzione di campioni prova	<p>Ogni lotto di produzione di campioni prova viene verificato per l'omogeneità e la stabilità.</p> <p>Prima di ogni inizio Circuito, viene controllata l'omogeneità dei campioni prova (10 flaconcini in doppio per le prove quantitative e 10 in singolo per le prove qualitative) e successivamente ne viene verificata la stabilità per tutto il periodo di esecuzione delle analisi previste dal circuito stesso (5 flaconcini in doppio/singolo il primo giorno previsto per le analisi e 5 flaconcini in doppio/singolo il terzo giorno). Per le analisi qualitative, per dare indicazione ai partecipanti della concentrazione del microrganismo, viene eseguito anche il conteggio in piastra.</p> <p>Le metodiche microbiologiche utilizzate per i controlli di qualità, ove previste, sono quelle stabilite dalle normative vigenti e sono accreditate in conformità alla norma ISO 17025.</p> <p>L'omogeneità dei campioni prova è un punto critico del processo. La mancanza di omogeneità per uno specifico microrganismo depone per il non utilizzo dei campioni prova per lo schema che prevede quel microrganismo.</p>

<p>Metodi statistici utilizzati per l'elaborazione dei risultati dei controlli qualità e dei partecipanti</p>	<p>Omogeneità e stabilità</p> <p>Per le prove quantitative, la valutazione dell'omogeneità e stabilità segue la ISO 13528:2015 e "The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC technical report, 2006)". Nel caso di conte inferiori a 40 l'omogeneità viene verificata utilizzando anche il test T_2 della ISO/TS 22117.</p> <p>Per le prove qualitative, la valutazione dell'omogeneità e stabilità viene valutata verificando la concordanza tra l'esito osservato e l'atteso.</p> <p>Elaborazione dei risultati</p> <p><u>Circuiti quantitativi in piastra</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • La valutazione della performance dei partecipanti alle prove quantitative è effettuata tramite z-score se il numero di osservazioni è sufficiente e se l'incertezza di misura del valore assegnato soddisfa le condizioni di accettabilità, altrimenti viene fornita solo un'analisi statistica descrittiva dei dati. • Il valore assegnato è dato dalla media robusta dei risultati nominali calcolata con l'Algoritmo A della ISO 13528:2015 nel caso di distribuzione unimodale e simmetrica. In presenza di forte asimmetria, il valore assegnato è dato dalla stima bootstrap della moda della funzione kernel dei dati nominali. Nel caso di distribuzione multimodale il valore assegnato è dato dalla stima bootstrap della moda della funzione kernel ritenuta vera sulla base di informazioni aggiuntive date dai partecipanti (procedura indicata in "The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories" (IUPAC technical report, 2006)). Nel caso in cui tali informazioni non fossero disponibili, si valuterà l'ipotesi di identificare la moda corretta tenendo conto dei risultati ottenuti in fase di verifica della stabilità da parte dell'organizzatore. • La deviazione standard target, $\sigma_t = 0.25$, è stata fissata dal provider e ritenuta accettabile in conformità a dati storici di circuiti per ogni microrganismo. • L'incertezza di misura del valore assegnato è data dal prodotto del fattore 1.25 per il rapporto tra la stima della deviazione standard robusta calcolata con l'Algoritmo A della ISO 13528:2015 e la radice del numero di osservazioni nel caso di unimodalità e simmetria della distribuzione dei dati. In presenza di forte asimmetria o multimodalità, l'incertezza del valore assegnato è data dallo standard error della moda ottenuto con tecniche bootstrap (procedura indicata in ISO 13528:2015 e "The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories" (IUPAC technical report, 2006)). <p><u>Circuiti quantitativi in MPN</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • La valutazione della performance dei partecipanti alle prove in MPN è effettuata valutando l'appartenenza del risultato ai limiti di accettabilità di $VA \pm 2\sigma_t$ e $VA \pm 3\sigma_t$, valori che diventano $VA \pm 3\sigma_t$ e $VA \pm 5\sigma_t$ nel caso di elevata variabilità dei dati. Il VA è determinato dalla mediana dei risultati nominali dei partecipanti. • $\sigma_t = 0.24$ nel caso 5 tubi in 3 diluizioni e $\sigma_t = 0.32$ nel caso 3 tubi in 3 diluizioni. <p><u>Circuiti qualitativi</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • La valutazione della performance dei partecipanti alle prove qualitative
---	---

	è effettuata tramite confronto dei suoi risultati nominali e di tutti gli esiti inviati con l'esito atteso.	
Criteri di valutazione della performance delle prove quantitative in piastra tramite z-score	$-2 \leq \text{z-score} \leq +2$	risultati accettabili
	$-3 < \text{z-score} < -2$ e $2 < \text{z-score} < 3$	risultati discutibili
	$\text{z-score} \leq -3$ e $\text{z-score} \geq +3$	risultati non accettabili
Criteri di valutazione della performance delle prove quantitative in MPN	$10^{\log_{10} \text{VA}-2\sigma_t} \leq x \leq 10^{\log_{10} \text{VA}+2\sigma_t}$	risultati accettabili
	$10^{\log_{10} \text{VA}-3\sigma_t} < x < 10^{\log_{10} \text{VA}-2\sigma_t}$ e $10^{\log_{10} \text{VA}+2\sigma_t} < x < 10^{\log_{10} \text{VA}+3\sigma_t}$	risultati discutibili
	$x \leq 10^{\log_{10} \text{VA}-3\sigma_t}$ e $x \geq 10^{\log_{10} \text{VA}+3\sigma_t}$	risultati non accettabili
	Nota: 2 e $3\sigma_t$ possono essere sostituiti da 3 e $5\sigma_t$	
Emissione report	<p>In attesa del report finale, subito dopo l'arrivo di tutti i risultati, viene pubblicato in Aquaweb un report parziale che rende noti la composizione del campione prova ed i risultati attesi ricavati dalla mediana dei risultati ottenuti dalle prove di stabilità effettuate dall'Organizzazione AQUA MA. Una volta pubblicato il report parziale i risultati inviati non possono più essere modificati.</p> <p>I report finali contengono, oltre ai risultati di ritorno dei partecipanti, alla loro elaborazione ed alla valutazione della loro performance (espressi con tabelle e grafici), le seguenti indicazioni:</p> <ul style="list-style-type: none"> • informazioni sulle specifiche analisi statistiche utilizzate (o i relativi riferimenti bibliografici) per la valutazione dell'omogeneità e della stabilità dei campioni prova e per l'elaborazione dei risultati. Per quanto riguarda l'omogeneità e la stabilità, vengono riportati nel report solo i valori finali elaborati, non vengono riportati i singoli risultati delle prove effettuate; tali dati sono disponibili, su richiesta, presso l'organizzazione; • i criteri di valutazione della performance dei partecipanti; • commenti e raccomandazioni basati sui risultati del circuito interlaboratorio. <p>I laboratori sono resi anonimi e identificati solo tramite codici alfa-numerici. I report finali vengono pubblicati sul sito web dell'IZSve ed in Aquaweb possibilmente entro 1 mese dal ricevimento di tutti i risultati.</p> <p>In caso di performance non conformi, è possibile richiedere all'Organizzazione la ripetizione delle prove, entro 2 mesi dalla data di emissione del report. I campioni prova richiesti sono gratuiti tranne le spese di spedizione.</p> <p>Ad ogni partecipante viene fornito anche un report annuale che raccoglie le valutazioni ottenute nei vari circuiti.</p> <p>Tutti i documenti di registrazione inerenti il circuito interlaboratorio vengono conservati per 10 anni, salvo diverse disposizioni di legge, nel qual caso prevalgono queste ultime.</p>	

Comunicazione con i partecipanti	<p>I partecipanti possono comunicare con l'Organizzazione del circuito in qualsiasi momento e con qualsiasi modalità, anche nel caso di perdita o di danneggiamento dei campioni prova.</p> <p>Eventuali cambiamenti nel programma o nelle operazioni dello schema vengono immediatamente comunicate.</p> <p>I partecipanti possono appellarsi relativamente alla valutazione della loro performance.</p> <p>Sono auspicabili informazioni di ritorno da parte dei partecipanti, al fine di migliorare costantemente il servizio.</p>
----------------------------------	---

Il Responsabile circuito interlaboratorio
Dr.ssa Maria Grimaldi

