

## ORGANIZZAZIONE DEL CIRCUITO INTERLABORATORIO AQUA

### Microbiologia alimentare (AQUA MA)

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 Tel. 049/8084306 e-mail: <a href="mailto:mgrimaldi@izsvenezie.it">mgrimaldi@izsvenezie.it</a>
Nome e recapiti del responsabile del "Circuito di Microbiologia alimentare"	Dr.ssa Maria Grimaldi Centro Servizi alla Produzione Tel. 049/8084306 e-mail: <a href="mailto:mgrimaldi@izsvenezie.it">mgrimaldi@izsvenezie.it</a>
Nome e recapiti dei responsabili tecnico e statistico del "Circuito di Microbiologia alimentare"	Responsabile tecnico: Dr.ssa Romina Trevisan Centro Servizi alla Produzione Tel. 049/8084152 e-mail: <a href="mailto:rtrevisan@izsvenezie.it">rtrevisan@izsvenezie.it</a>  Responsabile statistico: Dr.ssa Marzia Mancin Tel. 049/8084431 e-mail: <a href="mailto:mmancin@izsvenezie.it">mmancin@izsvenezie.it</a>
Obiettivo e struttura del Circuito	L'obiettivo del circuito AQUA MA è di offrire uno strumento per garantire l'assicurazione della qualità dei risultati in Microbiologia alimentare. Il circuito prevede schemi 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 del circuito	Nessuno.
Requisiti che permettano la partecipazione	Possono partecipare al Circuito, laboratori di Microbiologia alimentare attrezzati per manipolare microrganismi del Gruppo di Rischio 2 secondo la classificazione stabilita dall'Al. XLVI del D. Lgs. 09/04/2008, n° 81. Le iscrizioni dei nuovi clienti avvengono on-line tramite il sito web dell'IZSVe. L'iscrizione attribuisce al partecipante un codice alfa-numerico univoco e anonimo che consente l'accesso personalizzato (con utente e password) al gestionale Aquaweb. I clienti già iscritti, devono accedere ad Aquaweb per le successive iscrizioni.
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 uno schema è inferiore a 15,

	<p>l'Organizzazione valuta l'annullamento delle prove quantitative previste, prima dell'invio dello schema stesso.</p> <p>Se il numero dei laboratori iscritti ad uno schema è maggiore di 15 ma il numero di partecipanti è inferiore a 15, in una o più delle prove quantitative previste in quello schema, l'Organizzazione valuta l'annullamento della/delle prove quantitative stesse o l'utilizzo di una statistica di performance indipendente dai risultati dei partecipanti.</p> <p>In entrambi i casi il cliente viene informato.</p> <p>Viene valutato uno sconto sul costo dello schema in base ai vari casi che si dovessero presentare.</p>
Normativa e legislazione di riferimento	<p>Per la gestione del Circuito Interlaboratorio:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ISO/IEC 17043</li> <li>• ISO IEC 17025</li> <li>• ISO/TS 22117</li> <li>• ISO 13528</li> <li>• ISO 5725</li> </ul> <p>Per le metodiche utilizzate per le analisi microbiologiche:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Reg. 2073/2005 e successive modifiche</li> </ul> <p>Per le prove di omogeneità e stabilità:</p> <p>Prove quantitative:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ISO 7932:2004</li> <li>• ISO 10272-2:2017</li> <li>• ISO 7937:2004</li> <li>• ISO 21528-2:2017</li> <li>• ISO 16649-2:2001</li> <li>• ISO 16649-3:2015 / EC 1:2017</li> <li>• ISO 11290-2:2017</li> <li>• ISO 15213:2003</li> <li>• ISO 4833-1:2013 / Amd 1:2022</li> <li>• ISO 6888-2:2021</li> </ul> <p>Prove qualitative:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ISO 10272-1:2017</li> <li>• ISO 19020:2017</li> <li>• ISO 16654:2001 / Amd 1 2017</li> <li>• ISO 11290-1:2017</li> <li>• ISO 6579-1:2017/Amd1:2020</li> <li>• ISO 10273:2017</li> </ul> <p>Per le prove accreditate secondo normativa ISO/IEC 17025 si rimanda all'elenco prove pubblicato sul sito web di Accredia.</p>
Tipologie di campioni prova	<p>Campioni prova con matrice da aggiungere: liofilizzati in flaconcini di vetro contenenti i microrganismi target e non target, inviati con matrice alimentare da aggiungere.</p>
Analisi previste e calendario di pianificazione degli schemi	<p>Conta di:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Bacillus cereus</i></li> <li>• <i>Campylobacter</i> spp.</li> <li>• <i>Clostridium perfringens</i></li> <li>• Enterobatteri</li> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Escherichia coli</i> MPN</li> <li>• <i>Listeria monocytogenes</i></li> <li>• Microrganismi anaerobi solfito riduttori</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microrganismi mesofili</li> <li>• Stafilococchi coagulasi positivi</li> </ul> <p>Ricerca di:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Campylobacter</i> spp.</li> <li>• Enterotossine stafilococciche</li> <li>• <i>Escherichia coli</i> O157</li> <li>• <i>Listeria monocytogenes</i></li> <li>• <i>Salmonella</i> spp.</li> <li>• <i>Yersinia enterocolitica</i></li> </ul> <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, opportunamente caratterizzati.</p> <p>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 addizionare.</p>
Stoccaggio e distribuzione dei campioni prova	<p>I campioni prova vengono stoccati tra +2°C e +8°C e trasportati a temperatura controllata:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• per i laboratori periferici dell'IZSve tramite trasporto interno</li> <li>• per i partecipanti esterni tramite ditta autorizzata al trasporto di materiale biologico a temperatura controllata.</li> </ul> <p>E' possibile anche il ritiro dei campioni prova a carico del cliente, direttamente presso il laboratorio di produzione del circuito AQUA MA.</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 schema	<p>Per la ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> e di <i>Salmonella</i> spp. (matrice carne e latte) vengono inviati 3 campioni prova per ognuna delle due analisi.</p> <p>Per la ricerca di <i>Salmonella</i> spp. (matrice molluschi) viene inviato un unico campione prova.</p> <p>Per tutte le altre prove qualitative vengono inviati due campioni prova.</p> <p>Per le prove quantitative viene inviato un unico campione prova.</p>
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"> <li>• modalità di conservazione dei campioni prova fino all'inizio delle analisi</li> <li>• 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</li> <li>• analisi da effettuare e procedure da utilizzare, che possono essere: <ul style="list-style-type: none"> <li>➢ metodi indicati dallo schema</li> <li>➢ metodi di propria scelta (vedi note 1, 2 e 3)</li> </ul> </li> <li>• modalità di registrazione dei risultati tramite Aquaweb</li> <li>• date di inizio analisi (range di tre giorni) e data ultima di invio risposte</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• scheda di sicurezza</li> </ul> <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 (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> <p>Nota 3: per le metodiche qualitative, non viene valutata l'equivalenza dei metodi e si accettano anche i risultati di metodiche di biologia molecolare. Si fa presente però ai partecipanti che le verifiche di omogeneità e stabilità da parte del PTP sono effettuate con metodiche di microbiologia alimentare e la concordanza/discordanza dei risultati dei partecipanti è valutata esclusivamente in base al risultato atteso di ricerca del microrganismo vivo. Si consiglia quindi ai laboratori che utilizzano metodiche di biologia molecolare di effettuare la conferma microbiologica nel caso di risultati positivi in PCR che potrebbero altrimenti risultare non conformi nel caso di campioni con risultato assegnato: assenza.</p>
<p>Controlli di qualità (prove di omogeneità e stabilità) eseguiti su ogni lotto di produzione di campioni prova</p>	<p>Ogni lotto di produzione di campioni prova viene verificato per l'omogeneità e la stabilità.</p> <p>Prima di ogni inizio schema, 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 dallo schema 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.</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. L'eventuale presenza di instabilità viene invece considerata nella valutazione del partecipante.</p>
<p>Metodi statistici utilizzati per l'elaborazione dei risultati dei controlli qualità e dei partecipanti</p>	<p><b>Omogeneità e stabilità</b></p> <p>Per le prove quantitative, la valutazione dell'omogeneità e stabilità segue la ISO 13528. Nel caso di conte inferiori a 40 l'omogeneità viene verificata utilizzando anche il test <math>T_2</math> 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><b>Elaborazione dei risultati</b></p> <p><u>Circuiti quantitativi in piastra</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 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.</li> <li>• Il valore assegnato è dato dalla media robusta dei risultati nominali calcolata con l'Algoritmo A della ISO 13528 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</li> </ul>

	<p>assegnato è dato dalla stima bootstrap della moda della funzione kernel ritenuta vera sulla base di informazioni aggiuntive date dai partecipanti (procedura indicata in “<i>The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC technical report)</i>”). 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.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La deviazione standard target, <math>\sigma_t = 0.25</math>, è stata fissata dall’organizzatore. Tale scelta è supportata dall’esperienza del laboratorio che ritiene che i valori accettabili del circuito interlaboratorio non debbano scostarsi più di mezzo logaritmo dal valore assegnato (2 deviazioni standard). Tale scelta è anche supportata dalla ISO 22117 che riporta il valore 0.25 come valore di deviazione standard target comunemente utilizzato.</li> <li>• 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 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 e “<i>The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC technical report)</i>”).</li> </ul> <p>Nel caso speciale di un numero ridotto di partecipanti, si valuta la determinazione del valore assegnato e della sua incertezza come media ed errore standard dei dati di stabilità del provider, statistiche indipendenti dai risultati dei partecipanti.</p> <p><u>Circuiti quantitativi in MPN</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• La valutazione della performance dei partecipanti alle prove in MPN è effettuata valutando l’appartenenza del risultato ai limiti di accettabilità di <math>VA \pm 2\sigma_t</math> e <math>VA \pm 3\sigma_t</math>, valori che diventano <math>VA \pm 2.68\sigma_t</math> e <math>VA \pm 4\sigma_t</math>, nel caso di elevata variabilità dei dati, in accordo a quanto indicato nella ISO 22117. Il VA è determinato dalla mediana dei risultati nominali dei partecipanti.</li> <li>• <math>\sigma_t = 0.24</math> nel caso 5 tubi in 3 diluizioni e <math>\sigma_t = 0.32</math> nel caso 3 tubi in 3 diluizioni.</li> </ul> <p><u>Circuiti qualitativi</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 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.</li> </ul>						
<p>Criteria di valutazione della performance delle prove quantitative in piastra tramite z-score</p>	<table border="1"> <tr> <td><math>-2 \leq z\text{-score} \leq +2</math></td> <td>risultati accettabili</td> </tr> <tr> <td><math>-3 &lt; z\text{-score} &lt; -2</math> e <math>2 &lt; z\text{-score} &lt; 3</math></td> <td>risultati discutibili</td> </tr> <tr> <td><math>z\text{-score} \leq -3</math> e <math>z\text{-score} \geq +3</math></td> <td>risultati non accettabili</td> </tr> </table>	$-2 \leq z\text{-score} \leq +2$	risultati accettabili	$-3 < z\text{-score} < -2$ e $2 < z\text{-score} < 3$	risultati discutibili	$z\text{-score} \leq -3$ e $z\text{-score} \geq +3$	risultati non accettabili
$-2 \leq z\text{-score} \leq +2$	risultati accettabili						
$-3 < z\text{-score} < -2$ e $2 < z\text{-score} < 3$	risultati discutibili						
$z\text{-score} \leq -3$ e $z\text{-score} \geq +3$	risultati non accettabili						
<p>Criteria di valutazione della performance delle prove quantitative in MPN</p>	<table border="1"> <tr> <td><math>10^{\log_{10} VA - 2\sigma_t} \leq x \leq 10^{\log_{10} VA + 2\sigma_t}</math></td> <td>risultati accettabili</td> </tr> <tr> <td><math>10^{\log_{10} VA - 3\sigma_t} &lt; x &lt; 10^{\log_{10} VA - 2\sigma_t}</math> e <math>10^{\log_{10} VA + 2\sigma_t} &lt; x &lt; 10^{\log_{10} VA + 3\sigma_t}</math></td> <td>risultati discutibili</td> </tr> </table>	$10^{\log_{10} VA - 2\sigma_t} \leq x \leq 10^{\log_{10} VA + 2\sigma_t}$	risultati accettabili	$10^{\log_{10} VA - 3\sigma_t} < x < 10^{\log_{10} VA - 2\sigma_t}$ e $10^{\log_{10} VA + 2\sigma_t} < x < 10^{\log_{10} VA + 3\sigma_t}$	risultati discutibili		
$10^{\log_{10} VA - 2\sigma_t} \leq x \leq 10^{\log_{10} VA + 2\sigma_t}$	risultati accettabili						
$10^{\log_{10} VA - 3\sigma_t} < x < 10^{\log_{10} VA - 2\sigma_t}$ e $10^{\log_{10} VA + 2\sigma_t} < x < 10^{\log_{10} VA + 3\sigma_t}$	risultati discutibili						

	$x \leq 10^{\log_{10} VA - 3\sigma_t}$ e $x \geq 10^{\log_{10} VA + 3\sigma_t}$ risultati non accettabili  Nota: 2 e 3 $\sigma_t$ possono essere sostituiti da 2.68 e 4 $\sigma_t$
Emissione report	<p>Dopo l'arrivo dei risultati dei partecipanti, in attesa del report definitivo, i primi giorni della settimana successiva alla chiusura dello schema, 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>Il report definitivo contiene, 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"> <li>• 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. I singoli risultati delle prove effettuate sono disponibili, su richiesta, presso l'organizzazione;</li> <li>• i criteri di valutazione della performance dei partecipanti;</li> <li>• commenti e raccomandazioni basati sui risultati dello schema.</li> </ul> <p>Per ogni partecipante Aquaweb genera, in modo casuale, un codice identificativo numerico, che varia da report definitivo a report definitivo e che garantisce l'assoluto anonimato nel tempo. Il codice identificativo numerico specifico del partecipante per un determinato report, viene evidenziato al cliente in Aquaweb prima dell'apertura del report stesso. L'adozione di codici anonimi e, per le prove quantitative, lo stesso valore assegnato dato dal consenso dei partecipanti impediscono collusioni tra i partecipanti o falsificazioni di risultati.</p> <p>I report finali vengono pubblicati sul sito web dell'IZSve ed in Aquaweb 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. Le spese di spedizione sono a carico del destinatario.</p> <p>Nel caso in cui uno schema venga distribuito e alcune prove si dimostrino successivamente non adatte per la valutazione della <i>performance</i>, le stesse vengono annullate e ne viene data comunicazione ai partecipanti tramite email, da parte del responsabile del circuito, e tramite il report finale.</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 tramite e-mail o telefono, anche nel caso di perdita o di danneggiamento dei campioni prova.</p> <p>Eventuali cambiamenti nel programma o nelle operazioni del circuito vengono immediatamente comunicate.</p> <p>I partecipanti possono appellarsi relativamente alla valutazione della loro</p>

	<p>performance, entro 2 mesi dalla pubblicazione del report definitivo.</p> <p>Sono auspicabili informazioni di ritorno da parte dei partecipanti, al fine di migliorare costantemente il servizio.</p> <p>In ogni schema AQUA MA, alla pubblicazione del Report definitivo viene aperta la sezione: "CUSTOMER SATISFACTION" dove il partecipante può valutare lo schema in oggetto, cliccando lo smile verde, giallo o rosso. Il partecipante può lasciare anche le sue osservazioni e/o suggerimenti, in particolare se è stato selezionato lo smile giallo o rosso.</p> <p>I dati di customer satisfaction raccolti sono trattati ed utilizzati dall'IZSve, organizzatore del circuito interlaboratorio AQUA, nel rispetto della riservatezza e della privacy, secondo quanto previsto dal Regolamento UE 2016/679, allo scopo di migliorare continuamente il servizio offerto.</p> <p>I dati di customer satisfaction inviati non sono anonimi allo scopo di poter dialogare direttamente con i laboratori, in base ai commenti, suggerimenti o critiche espressi nel campo testuale della sezione, relativa ad ogni schema AQUA MA.</p> <p>Entro due mesi dalla data di emissione del report, i dati di customer satisfaction raccolti verranno valutati, per poter operare tempestivamente azioni correttive e/o di miglioramento.</p> <p>Le valutazioni degli schemi possono peraltro essere inserite anche dopo i due mesi. In tale caso la valutazione dei dati di customer satisfaction avviene in fase di riesame annuale della Direzione che viene svolto i primi mesi dell'anno successivo.</p>
--	--