

ORGANIZZAZIONE DEL PROFICIENCY TESTING AQUA

Microbiologia Alimentare (AQUA MA)

1. Obiettivo, campo di applicazione e struttura del PT

L'obiettivo dello Schema Proficiency testing (PT) AQUA MA è di offrire uno strumento volto a garantire l'assicurazione della qualità dei risultati in Microbiologia alimentare.

Il PT prevede schemi simultanei e continui che permettono un confronto tra i laboratori.

Calendario di pianificazione

Ogni anno viene predisposto e pubblicato sul sito web IZSVE un calendario contenente le distribuzioni, le analisi e le matrici alimentari previste.

Numero di distribuzioni per anno per ogni tipologia di analisi sulla stessa matrice

Una.

Informazioni tecniche specifiche

Le informazioni relative ai campioni prova, disponibili nell'applicativo Aquaweb e comunicate al partecipante tramite e-mail, sono le seguenti:

- 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 delle 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:
 - metodi indicati dallo schema.
 - metodi di propria scelta (vedi note 1e 2).
- modalità di registrazione dei risultati tramite Aquaweb.
- date di inizio analisi (range di tre giorni) e data ultima di invio delle risposte.
- scheda di sicurezza.

Nota 1: laddove esistano normative di legge (es. Regolamento (CE) 2073/2005) che stabiliscano i metodi da applicare è consigliabile seguire quanto previsto dalle stesse.

Nel caso in cui il partecipante per l'esecuzione delle prove utilizzi metodi interni questi vengono confrontati al fine di valutarne l'equivalenza tecnica. I risultati dei metodi considerati non equivalenti vengono elaborati separatamente laddove la numerosità dei dati lo consenta; se la numerosità non sia sufficiente si fornisce comunque una breve analisi statistica descrittiva.

Nota 2: per i metodi qualitativi, non viene valutata l'equivalenza dei metodi e sono accettati anche i risultati ottenuti con metodi di biologia molecolare. Tuttavia si fa presente ai partecipanti che le verifiche di omogeneità e stabilità da parte del PTP sono effettuate utilizzando metodi di microbiologia alimentare e la concordanza/discordanza dei risultati dei partecipanti viene valutata esclusivamente in base al risultato atteso di ricerca del microrganismo vivo.

Si raccomanda quindi ai laboratori che utilizzano metodi 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.

2. Numero e tipologia di partecipanti attesi e requisiti per la partecipazione

I partecipanti attesi sono laboratori pubblici e privati che possono inviare i risultati di più operatori, in più repliche e con più metodi.

Per le prove qualitative non è richiesto un numero minimo di partecipanti. Per le prove quantitative, invece, è necessario un numero sufficiente di risultati indicativamente pari a 15 dati, da valutare comunque nel contesto complessivo della distribuzione dei dati.

Se il numero dei laboratori iscritti ad uno schema è inferiore a 15, l'Organizzatore può valutare l'annullamento delle prove quantitative previste, prima dell'invio dello schema stesso.

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, il PTP può valutare l'annullamento della/delle prove quantitative stesse oppure di utilizzare una statistica di performance indipendente dai risultati dei partecipanti.

In entrambi i casi, il cliente viene informato tempestivamente e può essere valutato un adeguamento del costo dello schema. In base ai vari casi che si dovessero presentare.

Possono partecipare al PT i laboratori di microbiologia alimentare attrezzati per la manipolazione di microrganismi del Gruppo di Rischio 2 secondo la classificazione stabilita dall'All. XLVI del D. Lgs. 09/04/2008, n° 81.

3. Modalità di iscrizione

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) ad Aquaweb. I clienti già iscritti devono accedere ad Aquaweb per le successive adesioni.

L'iscrizione agli schemi può essere effettuata a partire dalla data di pubblicazione sul sito web dell'IZSve del calendario e sino al termine specificato nello stesso.

Con l'iscrizione allo schema del PT AQUA MA il cliente accetta le condizioni generali di contratto pubblicate sul sito web dell'IZSve.

4. Tipologie di campioni prova

I campioni prova consistono in liofilizzati contenuti in flaconcini di vetro, contenenti i microrganismi target e non target, da aggiungere con matrice alimentare fornita.

Contenuto e preparazione dei campioni prova

I campioni prova contengono generalmente microrganismi target e non target in modo tale da simulare le condizioni dei campioni di routine. I ceppi batterici utilizzati provengono da collezioni certificate (es. ATCC). Possono eventualmente essere utilizzati anche ceppi batterici di campo, opportunamente caratterizzati.

I microrganismi contaminanti, dopo la crescita in idoneo brodo di coltura, vengono aggiunti con un crioprotettore, aliquotati, liofilizzati e confezionati insieme alla matrice alimentare prevista pre-pesata da aggiungere.

Numero di campioni prova per schema

Per la ricerca di *Listeria monocytogenes* e di *Salmonella* spp. vengono inviati 3 campioni prova per ognuna delle due determinazioni.

Per la ricerca di *Salmonella* spp. (matrice molluschi) viene inviato un unico campione prova.

Per tutte le altre prove qualitative vengono inviati due campioni prova.

Per le prove quantitative viene inviato un unico campione prova.

5. Spedizione dei campioni prova

I campioni prova vengono confezionati in un contenitore che consente di mantenere la condizione di refrigerazione. La spedizione avviene:

- per i laboratori periferici dell'IZSve tramite trasporto interno.
- per i partecipanti esterni tramite ditta autorizzata al trasporto di materiale biologico.

E' possibile ritirare i campioni prova, direttamente presso il Laboratorio Accettazione Centralizzata dell'IZSve a carico del cliente.

In caso di perdita o di danneggiamento dei campioni prova, il PTP provvederà, a proprie spese, all'invio di un campione prova sostitutivo.

6. Metodi e misurandi

Le metodiche utilizzate nelle analisi microbiologiche per le prove di omogeneità e stabilità, sono quelle previste dal Reg. (CE) 2073/2005 e successive modifiche e integrazioni o da altra normativa di riferimento.

Per le prove accreditate secondo normativa ISO/IEC 17025 si rimanda all'elenco prove pubblicato sul sito web di Accredia.

PROVE QUANTITATIVE	
Metodo	Misurando
ISO 7932	<i>Bacillus cereus</i>
ISO 10272-2	<i>Campylobacter</i> spp.
ISO 15213-2	<i>Clostridium perfringens</i>
ISO 21528-2	Enterobatteri
ISO 16649-2	<i>Escherichia coli</i>
ISO 16649-3	<i>Escherichia coli</i> MPN
ISO 11290-2	<i>Listeria monocytogenes</i>
ISO 15213-1	Microrganismi anaerobi solfito riduttori
ISO 4833-1	Microrganismi mesofili
ISO 6888-2	Stafilococchi coagulasi positivi
PROVE QUALITATIVE	
Metodo	Misurando
ISO 10272-1	<i>Campylobacter</i> spp.
ISO 19020	Enterotossine stafilococciche
ISO 16654	<i>Escherichia coli</i> O157
ISO 11290-1	<i>Listeria monocytogenes</i>
ISO 6579-1	<i>Salmonella</i> spp.
ISO 10273	<i>Yersinia enterocolitica</i>

7. Controlli di qualità (prove di omogeneità e stabilità) eseguiti su ogni lotto di produzione di campioni prova

Ogni lotto di produzione di campioni prova viene verificato per l'omogeneità e la stabilità.

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.

Per le prove quantitative, la valutazione dell'omogeneità e stabilità segue la norma ISO 13528. Nel caso di conte inferiori a 40 l'omogeneità viene verificata utilizzando anche il test T₂ della norma ISO 22117.

Per le prove qualitative, la valutazione dell'omogeneità e stabilità viene valutata verificando la concordanza tra l'esito osservato e l'atteso.

I metodi microbiologici utilizzati per i controlli di qualità, ove previsti, sono quelli stabiliti dalle normative vigenti. 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.

8. Invio dei risultati da parte del partecipante

Il partecipante invia i risultati inserendoli in Aquaweb. Si accettano i risultati delle analisi da più operatori, in più repliche e con più metodi. Una volta inseriti i dati, il partecipante deve scegliere tra quelli inseriti, per ogni analisi, un unico risultato che sarà rappresentativo del laboratorio (sia per le prove quantitative che qualitative), cliccando il flag denominato "Nominale".

9. Metodi statistici e criteri di valutazione utilizzati per l'elaborazione dei risultati dei partecipanti

PT quantitativi in piastra

- 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.
- Nel caso i partecipanti indichino l'utilizzo di un metodo interno vengono verificate le informazioni fornite dai partecipanti in Aquaweb relativamente ai terreni utilizzati, ai tempi e alle temperature di incubazione adottate. Sulla base delle informazioni raccolte si definisce l'equivalenza o la non equivalenza del metodo interno adottato dal partecipante rispetto ai metodi normalizzati/ufficiali (ad esempio ISO, AFNOR, AOAC).
- Il valore assegnato è dato dalla media robusta dei risultati nominali calcolata con l'Algoritmo A della norma 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 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)"*). 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 dall'Organizzatore. Tale scelta è supportata dall'esperienza del laboratorio che ritiene che i valori accettabili del PT non debbano scostarsi più di mezzo logaritmo dal valore assegnato (2 deviazioni standard). Tale scelta è anche supportata dalla norma ISO 22117 che riporta il valore 0.25 come valore di deviazione standard target comunemente utilizzato.
- 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 norma 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 nella norma ISO 13528 e *"The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC technical report)"*).
- 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 dell'Organizzatore, statistiche indipendenti dai risultati dei partecipanti.

PT quantitativi in MPN

- 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 $VA \pm 2.68\sigma_t$ e $VA \pm 4\sigma_t$ nel caso di elevata variabilità dei dati, in accordo a quanto indicato nella norma ISO 22117. 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.

PT qualitativi

- 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.

10. Emissione report

Dopo l'arrivo dei risultati dei partecipanti, in attesa del report finale, i primi giorni della settimana successiva alla chiusura dello schema, viene pubblicato in Aquaweb un report preliminare che rende noti la composizione del campione prova ed i risultati attesi, ricavati dalla mediana dei risultati ottenuti dalle prove di stabilità effettuate dal PTP AQUA MA. Una volta pubblicato il report preliminare i risultati inviati non possono più essere modificati.

Il report finale 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:

- 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 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;
- i criteri di valutazione della performance dei partecipanti;
- la descrizione dei criteri adottati per valutare l'equivalenza dei metodi interni utilizzati dai partecipanti rispetto al metodo di riferimento;
- commenti e raccomandazioni basati sui risultati dello schema.

Per ogni partecipante Aquaweb genera, in modo casuale, un codice identificativo numerico, che si differenzia da report finale a report finale 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, il valore assegnato dato dal consenso dei partecipanti, impediscono collusioni tra i partecipanti o falsificazioni di risultati.

I report finali vengono pubblicati sul sito web IZSVE ed in Aquaweb entro 1 mese dal ricevimento di tutti i risultati.

In caso di performance non conformi, è possibile richiedere al PTP la ripetizione delle prove, entro 2 mesi dalla data di emissione del report finale. I campioni prova richiesti sono gratuiti. Le spese di spedizione sono a carico del destinatario.

Nel caso in cui uno schema venga distribuito e alcune prove si dimostrino successivamente non adatte per la valutazione della *performance*, le stesse vengono annullate e ne viene data comunicazione ai partecipanti tramite e-mail, da parte del responsabile dello schema del PT e riportate nel report finale.

Inoltre, Ad ogni partecipante viene fornito anche un report annuale che raccoglie le valutazioni ottenute nei vari schemi del PT a cui ha partecipato.

Tutti i documenti di registrazione inerenti il PT vengono conservati per 10 anni, salvo diverse disposizioni di legge, nel qual caso prevalgono queste ultime.

Criteri di valutazione della performance

Prove quantitative in piastra tramite z-score:

$-2 \leq z\text{-score} \leq +2$	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

Prove quantitative in MPN:

$10^{\log_{10} VA - 2\sigma} \leq x \leq 10^{\log_{10} VA + 2\sigma}$	risultati accettabili
$10^{\log_{10} VA - 3\sigma} < x < 10^{\log_{10} VA - 2\sigma}$ e $10^{\log_{10} VA + 2\sigma} < x < 10^{\log_{10} VA + 3\sigma}$	risultati discutibili
$x \leq 10^{\log_{10} VA - 3\sigma}$ e $x \geq 10^{\log_{10} VA + 3\sigma}$	risultati non accettabili

Nota: 2 e $3\sigma_t$ possono essere sostituiti da 2.68 e $4\sigma_t$

11. Comunicazione con i partecipanti

I partecipanti possono comunicare con l'Organizzazione del PT in qualsiasi momento tramite e-mail o telefono, anche nel caso di perdita o di danneggiamento dei campioni prova.

Eventuali cambiamenti nel programma o nelle fasi dello schema PT vengono immediatamente comunicate.

I partecipanti possono appellarsi relativamente alla valutazione della loro performance entro 2 mesi dalla pubblicazione del report finale.

Sono auspicabili informazioni di ritorno da parte dei partecipanti, al fine di migliorare costantemente il servizio offerto.

In ogni schema AQUA MA, alla pubblicazione del report finale viene aperta la sezione: "CUSTOMER SATISFACTION" dove il partecipante può valutare lo schema in oggetto, tramite uno 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.

I dati di customer satisfaction raccolti sono trattati ed utilizzati dall'IZS^{Ve}, Organizzatore del PT AQUA, nel rispetto della riservatezza e della privacy, secondo quanto previsto dal Regolamento (UE) 2016/679

I dati di customer satisfaction inviati non sono anonimi in modo da permettere un dialogo diretto con i laboratori, in relazione ai commenti, suggerimenti o critiche espressi nel campo testuale della sezione relativa ad ogni schema AQUA MA.

Entro due mesi dalla data di emissione del report finale, i dati di customer satisfaction raccolti vengono valutati, per poter operare tempestivamente azioni correttive e/o di miglioramento.

Le valutazioni degli schemi possono comunque essere inserite anche dopo tale termine. In questo caso la valutazione dei dati di customer satisfaction viene effettuata in sede di riesame annuale della Direzione.