



RAPPORTI ISTISAN 23|24

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Risultati del circuito interlaboratorio 2021 sulla determinazione dell'aflatossina M1 nel latte liofilizzato

B. De Santis, F. Debegnach, E. Gregori, G. Scialò, C. Notarfonso,
M. Grieco, P. Daminelli, F. Paterlini, A.A. Federici, C. Baiguera



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Risultati del circuito interlaboratorio 2021 sulla determinazione dell'aflatossina M1 nel latte liofilizzato

Barbara De Santis (a), Francesca Debegnach (a), Emanuela Gregori (a),
Giuseppina Scialò (a), Claudia Notarfonso (a), Martina Grieco (a),
Paolo Daminelli (b), Franco Paterlini (b), Adele Anna Federici (b),
Cristina Baiguera (b)

*(a) Dipartimento Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte Bovino,
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
23/24

Istituto Superiore di Sanità

Risultati del circuito interlaboratorio 2021 sulla determinazione dell'aflatossina M1 nel latte liofilizzato.

Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori, Giuseppina Scialò, Claudia Notarfonso, Martina Grieco, Paolo Daminelli, Franco Paterlini, Adele Anna Federici, Cristina Baiguera
2023, 40 p. Rapporti ISTISAN 23/24

Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Micotossine presso l'Istituto Superiore di Sanità organizza almeno una prova valutativa ogni anno per il circuito di laboratori ufficiali del Servizio Sanitario Nazionale. Nel 2021, in collaborazione con il Centro di riferimento per il latte bovino dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Emilia-Romagna e Lombardia, è stata organizzata una prova valutativa per la determinazione dell'aflatossina M1 nel latte. I laboratori invitati sono stati i laboratori del controllo ufficiale e alcuni laboratori privati. La maggioranza dei partecipanti ha ottenuto prestazioni soddisfacenti in termini di *z-score* e *ζ-score*.

Parole chiave: Aflatossina M1; Latte; Prove valutativa

Istituto Superiore di Sanità

Results of the Proficiency Test 2021 on determination of aflatoxin M1 in freeze-dried milk.

Barbara De Santis, Francesca Debegnach, Emanuela Gregori, Giuseppina Scialò, Claudia Notarfonso, Martina Grieco, Paolo Daminelli, Franco Paterlini, Adele Anna Federici, Cristina Baiguera
2023, 40 p. Rapporti ISTISAN 23/24 (in Italian)

Every year, the Italian National Reference Laboratory for Mycotoxin at the Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy) organizes proficiency test trials for the Italian network of the Official Laboratories. In 2021, a study for the determination of aflatoxin M1 in milk was organized in cooperation with the National Reference Centre for bovine milk quality. Laboratories invited to participate in this study are Official Control Laboratories and private laboratories. The majority of participants obtained a satisfactory performance (*z-score*, *ζ-score*).

Keywords: Aflatoxin M1; Milk; Proficiency test

Per informazioni su questo documento scrivere a: Inr-micotossine-tvn@iss.it

Si ringrazia Maria Cristina Barea Toscan per il supporto editoriale fornito nella preparazione del manoscritto.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it

Citare questo documento come segue:

De Santis B, Debegnach F, Gregori E, Scialò G, Notarfonso C, Grieco M, Daminelli P, Paterlini F, Federici AA, Baiguera C. *Risultati del circuito interlaboratorio 2021 sulla determinazione dell'aflatossina M1 nel latte liofilizzato*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2023. (Rapporti ISTISAN 23/24).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Rocco Bellantone*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Introduzione	1
Organizzazione della prova valutativa	3
Preparazione del materiale di prova.....	3
Omogeneità, stabilità del materiale di prova.....	3
Distribuzione, istruzioni per i partecipanti.....	3
Analisi statistica dei dati	4
Valori assegnati e incertezze associate	4
Scarto tipo per prova valutativa	4
Calcolo dello <i>z-score</i> e dello <i>ζ-score</i>	5
Valutazione dei risultati non-quantificati.....	5
Calcolo degli indici <i>h</i> e <i>k</i> del test di Mandel.....	6
Indice <i>k</i>	6
Indice <i>h</i>	7
Risultati e discussione	8
Omogeneità e stabilità	8
Ricerca degli <i>outlier</i> e valore assegnato	9
Risultati dei laboratori	12
Conclusioni	19
Bibliografia di riferimento	20
Appendice A	
Arruolamento dei laboratori.....	21
A1. Fac-simile lettera di invito ai Laboratori.....	23
A2. Fac-simile di scheda di partecipazione.....	24
A3. Laboratori registrati al PT	25
Appendice B	
Risultati sulle medie dei campioni A e B del PT ISS 2021 AFM1	27
Appendice C	
Informazioni tecniche sui metodi analitici dei partecipanti	33
Appendice D	
Rappresentazione grafica dei valori degli indici <i>h</i> , <i>k</i> di Mandel per i laboratori partecipanti	37

INTRODUZIONE

In accordo con l'articolo 37 del Regolamento (UE) 2017/625 tutti i laboratori coinvolti nelle analisi del controllo ufficiale devono dare evidenza delle loro competenze analitiche, per una prova specifica o per gruppi di prove. Inoltre, si stabilisce che i laboratori ufficiali designati dall'autorità competente, devono essere valutati e accreditati secondo i criteri descritti dalla norma internazionale ISO 17025:2017. Tra i vari requisiti previsti dalla norma ISO, la partecipazione a circuiti inter-laboratorio o prove valutative (PT, *Proficiency Test*) è considerata uno strumento per verificare le prestazioni del processo analitico utilizzato dal laboratorio e deve essere garantita almeno per le prove per le quali è stato richiesto o già ricevuto l'accreditamento. Infatti, nell'ambito delle attività di controllo qualità, il laboratorio deve dare evidenza del controllo di qualità interno ed esterno.

Il controllo di qualità interno può essere effettuato tramite l'uso di carte di controllo, di materiali di riferimento, e anche tramite la valutazione del fattore di recupero, l'effettuazione di prove di ripetibilità, sistematicamente messe in atto dal laboratorio. Lo scambio di campioni con un altro laboratorio e/o la partecipazione a circuiti inter-laboratorio sono invece utili strumenti per il controllo di qualità esterno. La partecipazione al PT permette di valutare in maniera indipendente la competenza del laboratorio e la sua conformità ai requisiti indicati nel Regolamento (UE) 2017/625.

Il presente PT è nato dalla collaborazione del Laboratorio Nazionale di Riferimento delle Micotossine presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) con il Centro di riferimento per il latte bovino dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Emilia-Romagna e Lombardia ed è stato progettato secondo il protocollo internazionale armonizzato per i PT dell'*International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e in conformità con quanto indicato nella norma ISO 17043:2010 per la determinazione della aflatoxina M1 (AFM1) nel latte liofilizzato. Per il 2021 il PT è stato codificato come PT ISS 2021 AFM1.

Le micotossine sono contaminanti naturali di alimenti e mangimi, prodotti principalmente da muffe dei generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Il numero di micotossine note per i loro effetti tossici sulla salute umana e animale è in costante aumento, così come le disposizioni legislative adottate per controllare la loro presenza negli alimenti e nei mangimi.

Le aflatoxine sono i metaboliti secondari tossici prodotti dalle specie fungine *A. flavus* e *A. parasiticus*. Sono note per essere i più potenti tossici naturali di origine alimentare. Le aflatoxine mostrano stabilità termica, anche ad alte temperature (> 100°C), che ne impedisce la degradazione durante la preparazione e il trattamento degli alimenti. L'aflatoxina M1 (AFM1) è il principale metabolita dell'aflatoxina B1 (AFB1), in quanto è il prodotto del *carry-over* dell'AFB1 quando gli animali sono alimentati con mangimi contaminati da aflatoxine. Le vacche da latte che ingeriscono mangime contaminato da AFB1 metabolizzano questa tossina in un arco di tempo tra le 4 e le 6 ore e liberano nel latte la tossina sotto forma dell'idrossido AFM1, in percentuali che vanno dall'1 al 6%. Nell'Unione Europea, il valore massimo stabilito per l'AFM1 nel latte è di 0,050 µg/kg.

La tossina è stata classificata dalla *International Agency for Research on Cancer* (IARC) come agente cancerogeno per l'uomo (gruppo 1) con un fattore di potenza cancerogena pari a 0,1 rispetto alla AFB1. Pertanto, nel calcolo della valutazione dell'esposizione, non essendo disponibile per l'AFM1 una *Benchmark Dose* ovvero un valore della dose minima della sostanza che produce un chiaro rischio per la salute di basso livello (di solito nell'intervallo di una variazione dell'1-10%) per uno specifico effetto tossico, si è considerato come parametro di riferimento tossicologico il valore di *Benchmark Dose Lower Level* al 10% (BMDL10) pari a 4

$\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./giorno, ottenuto moltiplicando per 10 il valore di BMDL10 della AFB1 pari a 0,400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./giorno. Questo approccio, utilizzato dalla *European Food Safety Authority* (EFSA) per il rischio tossicologico da aflatossine, segue le valutazioni del *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) e dello *Scientific Committee on Food* (SCF) che, pur non avendo stabilito un *Health-Based Guidance Value* (HBGV) per l'aflatossina M1, hanno concluso che livelli di esposizione <1 ng/kg p.c./giorno possono contribuire ad una maggiore incidenza di cancro. Questa indicazione era peraltro in linea con quanto proposto da Tina Kuiper-Goodman che nel 1990 ha stimato la *Tolerable Daily Intake* (TDI) della AFM1, dividendo la *Tolerance Dose* al 50% (TD50) per un fattore di sicurezza pari a 5000, ottenendo un valore pari a 0,2 ng/kg p.c./giorno. Tale valore corrisponde ad un livello di rischio di cancerogenesi pari ad 1/100.000.

La IARC ha classificato le aflatossine come un gruppo cancerogeno per l'uomo (Gruppo 1) che causa carcinomi epatocellulari (HCC). In particolare, studi in vitro hanno mostrato una differenza nella potenza degli effetti genotossici tra AFB1 e l'aflatossina G1 (AFG1) con l'indicazione che nelle cellule epatiche l'AFG1 è meno tossica della AFB1 di circa un fattore 10; la potenza assoluta della tossicità di AFB2 e l'aflatossina G2 (AFG2) non è stata definita ma la letteratura suggerisce che le due siano meno potenti dell'AFB1; infine, per l'AFM1, è noto che ha una potenza di indurre il cancro al fegato di circa un ordine di grandezza inferiore a quella di AFB1. Nel 2020, come parametro di riferimento per la valutazione del rischio, EFSA ha quindi ha selezionato un limite di confidenza inferiore della dose di riferimento (BMDL), per un benchmark di risposta del 10%, un valore di 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ di peso corporeo al giorno (per l'incidenza di HCC nei ratti maschi) ed ha stabilito per l'AFM1 un fattore di potenza di 0,1 relativo all'AFB1.

Sulla base di queste evidenze, i livelli di contaminazione di queste tossine negli alimenti sono monitorati sia nel contesto del controllo ufficiale che nel contesto dell'autocontrollo aziendale per avere a disposizione materia prima e prodotti derivati a garanzia della sicurezza della salute dell'uomo e dell'animale.

ORGANIZZAZIONE DELLA PROVA VALUTATIVA

Preparazione del materiale di prova

I materiali di prova utilizzati sono stati preparati presso il laboratorio del Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte Bovino, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna.

I due materiali di prova liofilizzati A e B provengono da due partite di latte artificialmente contaminate con una quantità opportuna di soluzione di materiale di riferimento di AFM1. Dopo la contaminazione del latte fresco, i due campioni A e B sono stati aliquotati in contenitori/provette da 5 g, e quindi liofilizzati e conservati chiusi ermeticamente a temperatura inferiore a -18°C fino al momento della distribuzione.

I campioni nei contenitori sono stati codificati con codici alfanumerici e per ogni partecipante è stato preparato un set di 2 campioni. Ciascun set di campioni era costituito da un campione selezionato casualmente di materiale A e uno di materiale B.

Omogeneità, stabilità del materiale di prova

Per verificare l'omogeneità dei due materiali del PT, 8 contenitori di materiali A e 8 di materiale B sono stati selezionati in modo casuale e sono stati analizzati in duplicato. L'omogeneità di entrambi i materiali è stata valutata secondo l'*International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of Analytical Laboratories*. La stabilità è stata valutata per testare significative differenze nei livelli di AFM1 fra i mesi precedenti la prova e quelli successivi. Per la verifica di stabilità è stato usato il test ANOVA (*ANALYSIS OF VARIANCE*) ad una via per dati raggruppati nel mese.

Distribuzione, istruzioni per i partecipanti

Gli inviti ai laboratori sono stati spediti via e-mail il 26 luglio 2021 (Appendice A1). Ventotto tra i laboratori contattati hanno aderito al PT (Appendice A2 e A3). Ogni partecipante è stato libero di usare il proprio metodo secondo la procedura di routine.

Ciascun partecipante ha ricevuto un codice laboratorio assegnato in modo casuale. L'identità dei laboratori è rimasta riservata. I set di campioni, costituiti da due campioni codificati A e B, sono stati inviati tramite corriere ai partecipanti il 27 agosto 2021. I materiali sono stati spediti a temperatura ambiente ed è stato richiesto di conservare il campione a -18°C fino al momento dell'analisi.

È stata richiesta una analisi in doppio per l'AFM1 da ciascun campione (A e B). Il termine per la presentazione dei risultati quantitativi era stato fissato al 15 novembre 2021, il che ha consentito ai partecipanti di disporre di dieci settimane per l'analisi dei campioni di prova. Tutti i risultati, tranne uno, sono stati presentati entro la scadenza. Quattro partecipanti non sono stati in grado di consegnare i risultati.

Ai partecipanti è stato chiesto di analizzare ciascun campione (A e B) con analisi in doppio (A1, A2 e B1, B2), di fornire i risultati in µg/kg, di non correggere il risultato per il recupero, di

riportare la percentuale di recupero, e di fornire l'incertezza di misura con il fattore di copertura (k). Il termine per la presentazione dei risultati quantitativi è stato fissato al 15 novembre 2021.

Ogni partecipante ha ricevuto:

- due materiali di prova numerati singolarmente;
- un campione sentinella;
- una lettera di presentazione;
- un modulo di ricezione;
- un modulo Risultati Scheda ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*);
- un modulo Risultati Scheda HPLC o LC-MS/MS (*High Performance Liquid Chromatography* o *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*);
- un modulo Risultati questionario HPLC o LC-MS/MS;
- un numero di codice del laboratorio.

Analisi statistica dei dati

La valutazione statistica dei risultati presentati è stata effettuata secondo l'*International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories*, ISO 13528:2015 e gli approfondimenti pubblicati dall'*Analytical Methods Committee* per quanto riguarda le statistiche robuste.

La valutazione dei risultati si è basata sui valori assegnati e sullo scarto tipo per la valutazione delle competenze (σ_{PT}). Sono stati calcolati il valore assegnato per il campione A e per il campione B prendendo in considerazione la totalità dei risultati consegnati. Da questo, gli *z-score* per ciascuna replica (1 e 2) dei due campioni (A e B) sono stati calcolati per classificare le prestazioni dei partecipanti.

Valori assegnati e incertezze associate

Come valore assegnato è stato utilizzato il valore di consenso basato sui risultati dei partecipanti. Il valore di consenso in questo PT è stato ottenuto calcolando la media robusta \bar{X} . La \bar{X} e lo scarto tipo robusto (σ_{rob}) sono stati calcolati utilizzando l'algoritmo A (secondo ISO 13528:2015), e a partire da quest'ultimo è stata calcolata l'incertezza associata. Il valore assegnato, lo scarto tipo robusto e l'incertezza sono stati stabiliti per il campione A e il campione B prendendo in considerazione la totalità dei singoli risultati consegnati dai laboratori.

Scarto tipo per prova valutativa

Per la valutazione della competenza del laboratorio, è stato utilizzato uno scarto tipo standard fisso del 25%. La motivazione alla base di questo dato è fornita dallo *European Union Reference Laboratory* per le Micotossine (EURL-MP) che ritiene che questo valore generico sia adatto allo scopo e che rifletta le attuali capacità analitiche e le migliori pratiche per la determinazione delle micotossine e delle tossine vegetali negli alimenti e nei mangimi.

Al fine di verificare la presenza di distribuzioni unimodali e approssimativamente simmetriche nel dataset dei risultati consegnati, sono stati esaminati i diagrammi di densità (*kernel density plot*) dei dati utilizzando una densità normale e la larghezza di banda fissata a $0,75\sigma_{PT}$. Quando vi è un'evidenza di unimodalità o se la seconda modalità contribuisce per meno del 5% circa alla

distribuzione della densità del *kernel*, è ancora possibile considerare la media robusta e il suo scarto tipo.

Calcolo dello *z-score* e dello ζ -score

Le prestazioni dei singoli laboratori sono state espresse in termini di *z-score* in conformità alla norma ISO 13528 e all'*International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of Analytical Laboratories*.

Lo *z-score* dei partecipanti è stato calcolato come segue:

$$z\text{-score} = \frac{(x_{\text{lab}} - \hat{X})}{\sigma_{PT}}$$

dove: x_{lab} è il risultato del laboratorio ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
 \hat{X} è il valore assegnato ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
 σ_{PT} è lo scarto tipo del PT ($\mu\text{g}/\text{kg}$).

A seconda del valore dello *z-score* del partecipante si prospettano tre scenari:

1. $|z| \leq 2$, il risultato è considerato “Soddisfacente”;
2. $2 < |z| \leq 3$, il risultato è “Discutibile”;
3. $|z| > 3$, il risultato è “Insoddisfacente”.

Lo ζ -score dei partecipanti è stato calcolato come segue:

$$\zeta\text{-score} = \frac{(x_{\text{lab}} - \hat{X})}{\sqrt{u_{\text{lab}}^2 + u_{\text{ref}}^2}}$$

dove: u_{lab} è l'incertezza standard riportata dal laboratorio
 u_{ref} è l'incertezza standard del valore assegnato.

Tutte le grandezze considerate sono espresse in $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Il valore ζ -score è stato utilizzato come indicazione della coerenza dell'incertezza fornita dal partecipante (u_{lab}) con lo scostamento osservato dal valore assegnato (u_{ref}). I valori di ζ -score insoddisfacenti ($|\zeta| > 2$) possono indicare una sottostima dell'incertezza o una grande deviazione del risultato dal valore assegnato, indicando un valore di incertezza non coerente con l'incertezza del valore di riferimento. Valori insoddisfacenti di *z-score* e ζ -score possono presentarsi quando i valori dell'incertezza non sono in accordo con la deviazione osservata dal valore assegnato, quindi è utile considerare insieme i valori di *z* e ζ -score.

Valutazione dei risultati non-quantificati

Quando il risultato è riportato con la dicitura “al di sotto del limite of quantificazione” (*Limit of Quantification*, LOQ) ($< \text{LOQ}$ o “ $< x \mu\text{g}/\text{kg}$ ”, e specifica del valore), si valuta il *proxy-z-score*, che consente di valutare i possibili falsi negativi, il valore del LOQ rispetto al valore assegnato, e il valore del LOQ rispetto a ciò che è analiticamente fattibile sulla base di quanto gli altri laboratori hanno prodotto.

I *proxy-z-score* sono calcolati come segue:

$$proxy-z-score = \frac{(x_{lab} - \bar{X})}{\sigma_{PT}}$$

dove x_{lab} è il risultato fornito dal laboratorio, come $< x$ $\mu\text{g}/\text{kg}$
 \bar{X} è il valore assegnato, $\mu\text{g}/\text{kg}$
 σ_{PT} è lo scarto tipo per il PT, $\mu\text{g}/\text{kg}$

I *proxy-z-score* non sono inclusi nelle rappresentazioni grafiche degli *score* dei partecipanti. Le interpretazioni di valutazione sono le seguenti:

- $proxy-z-score \leq -3$
in base al LOQ fornito, il laboratorio dovrebbe essere in grado di rilevare e quantificare l'analita. Il risultato è classificato come un falso negativo (FN). Un falso negativo viene interpretato come prestazione "Insoddisfacente".
- $-3 < proxy-z-score < -2$
in base al LOQ fornito, è probabile che il laboratorio sia in grado di rilevare e quantificare l'analita. Il risultato è classificato come un falso negativo (FN) e deve essere interpretato come "Discutibile".
- $-2 \leq proxy-z-score \leq 2$
 - i) (-2 a 0) in base al valore assegnato e al LOQ fornito, il risultato non può essere classificato come falso negativo.
 - ii) (0 a 2) il LOQ è compreso nell'intervallo di ciò che è analiticamente fattibile sulla base di quanto gli altri laboratori hanno prodotto.
- $2 < proxy-z-score < 3$
il LOQ è elevato rispetto a ciò che è analiticamente fattibile. Il laboratorio dovrebbe prendere in considerazione di abbassare il valore del LOQ.
- $proxy-z-score \geq 3$
il LOQ è elevato rispetto a ciò che è analiticamente fattibile. Il LOQ associato al metodo non può essere considerato accettabile.

Calcolo degli indici h e k del test di Mandel

La disponibilità delle analisi replicate per ciascun campione (A1 e A2 per il campione A e B1 e B2 per il campione B) ha permesso di elaborare le statistiche di Mandel.

Attraverso la misura degli indici h e k sono state fatte valutazioni sia sulla variabilità delle misurazioni delle repliche in un laboratorio rispetto alla variabilità del pool di tutti i laboratori (scarto tipo di ripetibilità) che sulla valutazione dell'accuratezza dei risultati dei campioni replicati di un laboratorio rispetto agli altri sulla base del valore di consenso del PT.

Indice k

Posto p il numero di laboratori partecipanti e n il numero di ripetizioni in laboratorio, il valore di k_j per il laboratorio j-esimo è calcolato con la formula:

$$k_j = \frac{s_j}{s_r}$$

con:

$$s_j = \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_{i,j} - \bar{x}_j)^2} / n \quad \text{e} \quad s_r = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^p s_j^2}{p}}$$

Per quanto riguarda l'interpretazione del valore k , questo confronta lo scarto tipo della ripetibilità dei dati del laboratorio con lo scarto tipo derivante dalla varianza media ponderata.

Dal valore k si può valutare la dispersione del set di dati e la sua accuratezza. Questa statistica riflette la ripetibilità del singolo laboratorio e la ripetibilità media di tutti i laboratori partecipanti. Più alto è il valore k , maggiore è lo scarto tipo dei dati, il che indica una precisione modesta.

Il valore critico k (k -crit) viene calcolato con la formula seguente e quando il valore k_j del singolo laboratorio j -esimo è superiore al k -crit, si può concludere che lo scarto tipo del risultato del test è elevato e l'accuratezza del laboratorio è messa in discussione.

$$k\text{-crit} = \sqrt{\frac{p}{1+(p-1)/F}}$$

dove: F , è il valore di F ($v_1; v_2$) con gradi di libertà $v_1 [(n-1)]$ e $v_2 [(p-1) (n-1)]$.

Indice h

Il valore di h è calcolato con la formula:

$$h_j = \frac{d_j}{s_{\bar{x}}}$$

dove: $d_j = \bar{x}_j - \bar{\bar{x}}$ è la differenza fra il valore medio del singolo laboratorio e la media di tutti i laboratori

$$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^p d_j^2}{p-1}}$$

è lo scarto tipo della media di tutti i laboratori.

In questo caso, lo scarto tipo $s_{\bar{x}}$ del risultato medio del j -esimo laboratorio dalla media complessiva confrontato con lo scarto tipo dell'intero set di dati, darà il valore dell'indice h_j . Il valore statistico di h riflette la deviazione della media del j -esimo laboratorio dalla media complessiva dei risultati ottenuti da tutti i laboratori partecipanti. Maggiore è il valore dell'indice h , maggiore è la deviazione e minore è l'accuratezza di quel singolo laboratorio.

Il valore di critico di h (h -critico) viene calcolato con la formula:

$$h\text{-crit} = \pm \frac{t(p-1)}{\sqrt{p(t^2+p-2)}}$$

dove: t , è la distribuzione t di Student con $\alpha = 0,05$ e gradi di libertà v ($v, p-2$);
 p , è il numero di laboratori partecipanti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Omogeneità e stabilità

Entrambi i materiali si sono rivelati sufficientemente omogenei per questo PT. I risultati dello studio di omogeneità dei materiali A e B sono presentati nelle Tabelle 1a e 1b.

Tabella 1a. Campione A: studio dell'omogeneità. PT ISS 2021 AFM1

ID campione	AFM1 µg/kg		Media
	Replicato 1	Replicato 2	
1	0,0348	0,0364	0,0356
2	0,0328	0,0332	0,0330
3	0,0321	0,0339	0,0330
4	0,0343	0,0331	0,0337
5	0,0323	0,0325	0,0324
6	0,0329	0,0339	0,0334
7	0,0342	0,0347	0,0345
8	0,0343	0,0352	0,0347
Media	0,0338		
n.	8		
Test di Cochran	0,3258		
Scarto tipo target omogeneità (σ_h)	0,0084		
Scarto tipo target %	25%		
S_{an}	0,00076		
S^2_{sam}	0,00000085		
σ_{all}	0,00253		
$S_{an} < 0,5 (\sigma_h)$	ACCETTATO		
Valore critico	0,00001		
$s^2_{sam} < \text{valore critico}$	ACCETTATO		

Tabella 1b. Campione B: studio dell'omogeneità. PT ISS 2021 AFM1

ID campione	AFM1 µg/kg		Media
	Replicato 1	Replicato 2	
1	0,0621	0,0692	0,0656
2	0,0647	0,0636	0,0641
3	0,0636	0,0662	0,0649
4	0,0713	0,0660	0,0686
5	0,0619	0,0647	0,0633
6	0,0660	0,0651	0,0655
7	0,0631	0,0631	0,0631
8	0,0625	0,0673	0,0649
Media	0,0650		
n.	8		
Test di Cochran	0,4239		
Scarto tipo target omogeneità (σ_h)	0,0163		
Scarto tipo target %	25%		
S_{an}	0,003		
S^2_{sam}	0		
σ_{all}	0,00488		
$S_{an} < 0,5 (\sigma_h)$	ACCETTATO		
Valore critico	0,00006		
$s^2_{sam} < \text{valore critico}$	ACCETTATO		

Lo studio di omogeneità ha preceduto le analisi dei laboratori partecipanti al circuito inter-laboratorio, il valore dello scarto tipo target omogeneità (σ_h) indicato è calcolato sulla media delle prove eseguite durante lo studio di omogeneità.

Lo studio di stabilità dell'analita nel tempo è stato condotto prendendo in considerazione risultati analitici relativi a due mesi precedenti e due mesi successivi l'esecuzione dello studio inter-laboratorio. I risultati relativi agli esiti dei test statistici del campione A, presentati nella Tabella 2a e 2b, hanno scartato tendenze e da attribuire ad un problema di instabilità del materiale. Per analogia di preparazione e allestimento, conservazione e gestione, gli esiti del campione A sono stati estesi anche al campione B.

Tabella 2a. Campione A: dati per lo studio della stabilità nel tempo (2 mesi precedenti e due successivi allo studio). PT ISS 2021 AFM1

Mese 2021	Conteggio	Somma	Media	Varianza
maggio	15	0,5379	0,0359	0,000006
giugno	15	0,5417	0,0361	0,000007
settembre	15	0,5468	0,0365	0,000009
ottobre	15	0,5479	0,0365	0,000008

Tabella 2b. Campione A: risultati del test ANOVA nello studio di stabilità. PT ISS 2021 AFM1

Origine della variazione	Somme quadrati	Gradi di libertà	Medie Quadrati	F	Valore di significatività	F crit
Tra mesi	4,28E-06	3	1,43E-06	0,1851	0,9061	2,7694
Nel mese	0,000432	56	7,71E-06			
Totale	0,000436	59				

Ricerca degli *outlier* e valore assegnato

Prima di procedere al calcolo dei valori di *z-score* e ζ -score, è stata fatta una verifica dell'ipotesi di distribuzione normale dei dati per controllare la presenza di *outlier*. Proprio al fine di escludere una distorsione dall'andamento normale si è proceduto alla verifica visiva del *normal probability plot* e del *kernel density plot* (Figure 1 e 2). I grafici del *kernel density* (con larghezza di banda pari a $0,75\sigma_{PT}$) hanno dato evidenza di unimodalità per il campione A e per il campione B. Ciò, unitamente alla non-normalità dei dati (evidenziata dal test di Shapiro-Wilk: campione A, $W=0,90449$, $p_{value}=0,0013$; campione B, $W=0,92512$, $p_{value}=0,0063$) ha confortato nell'uso della statistica robusta per il trattamento dei dati per il calcolo della media robusta e del suo scarto tipo. Il calcolo del valore assegnato (\hat{X} , la media robusta) e dello scarto tipo robusto (σ_{rob}) sono stati eseguiti sull'intero dataset dei risultati ottenuti per il campione A e per il campione B.

La Tabella 3 riassume i parametri rilevanti ottenuti per i due campioni: il valore assegnato (la media robusta), l'incertezza del valore assegnato (u), lo scarto tipo standard per la valutazione della competenza (σ_{PT}) e scarto tipo robusto (assoluto e relativo percentuale) e la distribuzione dei risultati ottenuti nelle classi di *z-score* e ζ -score.

Per la valutazione dei punteggi, è stato scelto di eseguire i calcoli sulle singole repliche considerate come prove indipendenti, ciò per dare la possibilità ai laboratori che analizzano nella routine il campione in singolo di avere un'informazione fruibile per ognuna delle due repliche. Ad ogni buon conto Nell'Appendice B sono riportate statistiche e grafici degli *z-score* e ζ -score ottenuti con i dati mediati sulle due repliche sia per il campione A che B. Si può notare come i parametri ottenuti con i valori mediati presenta valori assegnati e scarto tipo del tutto sovrapponibili.

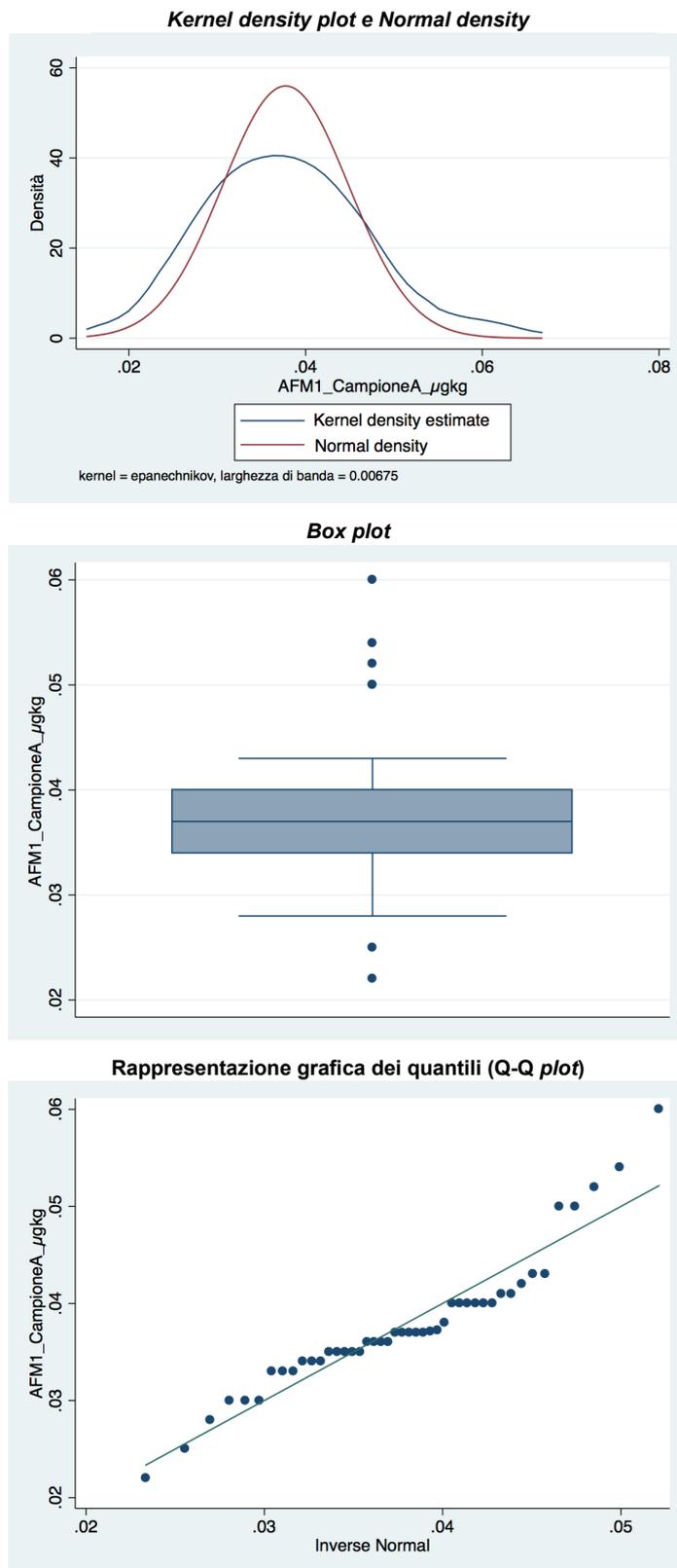


Figura 1. CAMPIONE A: kernel density plot, box plot e Q-Q plot. PT ISS 2021 AFM1

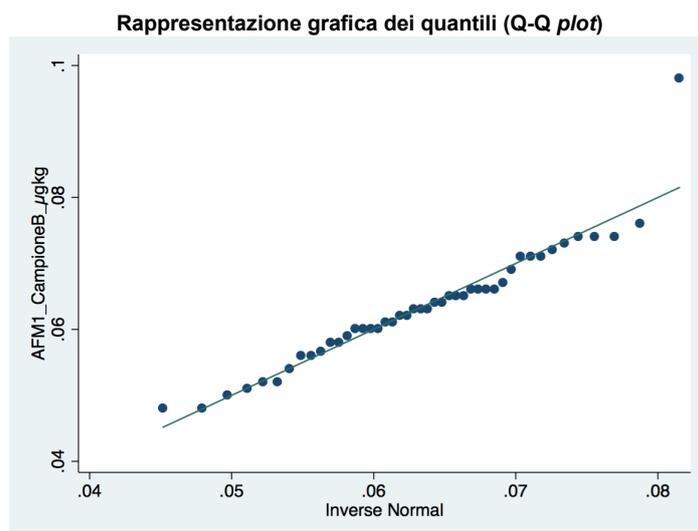
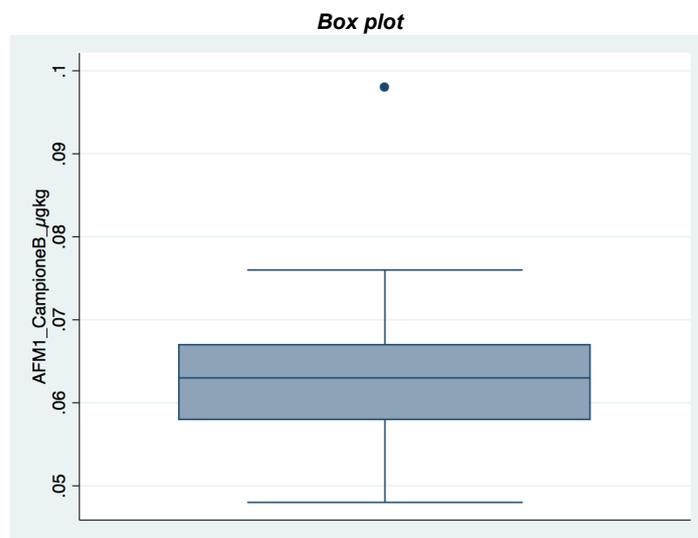
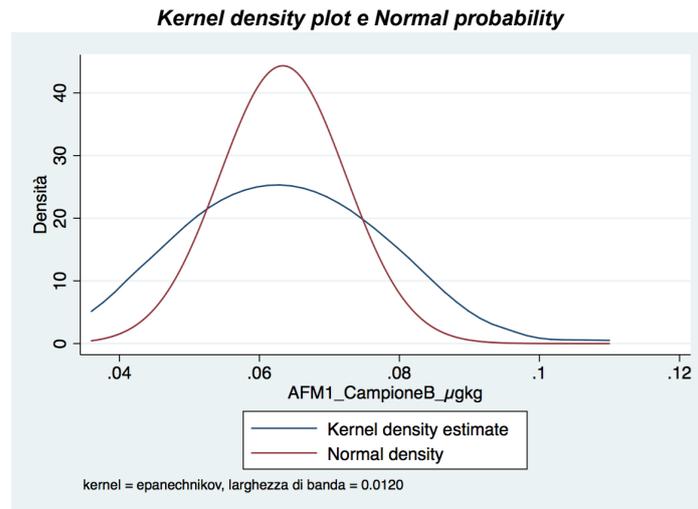


Figura 2. CAMPIONE B: kernel density plot, box plot e Q-Q plot. PT ISS 2021 AFM1

Tabella 3. Parametri relativi alla prova valutativa e numero dei risultati quantitativi e dei laboratori in ciascuna fascia di z-score e ζ -score. PT ISS 2021 AFM1

Parametro	AFM1 campione A		AFM1 campione B	
\hat{x} , $\mu\text{g}/\text{kg}$ valore assegnato	0,037		0,063	
u , $\mu\text{g}/\text{kg}$ incertezza del valore assegnato	0,0008		0,0014	
σ_{PT} , $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,009		0,016	
$u > 0,3 \sigma_{PT}$	no		no	
σ_{rob} , $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,004		0,008	
σ_{rob} , %	12		12	
	replica 1 (A1)	replica 2 (A2)	replica 1 (B1)	replica 2 (B2)
z-score				
n. risultati quantitativi	24	21	24	21
$ z \leq 2$	24	20	24	21
$2 < z < 3$	0	1	0	0
$ z \geq 3$	0	0	0	0
ζ-score				
n. risultati quantitativi	16	13	16	13
$ \zeta \leq 2$	13	13	14	11
$2 < \zeta < 3$	2	0	0	0
$ \zeta \geq 3$	1	0	2	2

I valori numerici sono arrotondati.

Risultati dei laboratori

Hanno aderito al PT 28 partecipanti, di cui 24 hanno spedito i risultati rispettando i termini fissati. I quattro partecipanti che si sono ritirati hanno comunicato di non essere in grado di consegnare i risultati. Come segnalato dai partecipanti, la maggior parte dei pacchi è stata ricevuta entro 24 ore dalla spedizione. Tutti i campioni sono stati ricevuti in buono stato.

Ai laboratori era stato chiesto di analizzare due campioni (campione A e campione B) in doppio (replica 1 A/B e replica 2 A/B) per determinare il contenuto di aflatoxina M1 utilizzando un metodo di loro scelta. Le informazioni sulle tecniche analitiche raccolte sono riportate nell'Appendice C.

Ventuno laboratori hanno riportato risultati quantitativi per i due replicati, 2 laboratori hanno consegnato risultati replicati per i due campioni ottenuti con analisi sia in HPLC che ELISA, 3 laboratori hanno riportato il risultato per una sola replica e un laboratorio ha fornito risultati espressi come <LOQ (cioè senza riportare un valore quantitativo) per entrambe i replicati dei due campioni e un laboratorio ha riportato il risultato come qualitativo (risultato >LOQ). Due laboratori hanno comunicato di essere impossibilitati ad eseguire l'analisi di conferma con HPLC. La Tabella 4 mostra i risultati consegnati da ciascun laboratorio. Graficamente i risultati, in termini di z-score e ζ -score, sono rappresentati nelle Figure 3 e 4 per le due aliquote del campione A, e nelle Figure 5 e 6 per le due aliquote del campione B.

Nelle tabelle i risultati di analisi in HPLC sono riportati come valori non corretti per il recupero quando il laboratorio ha indicato un recupero nell'intervallo 90-110%, come da Regolamento (CE) 401/2006 par 4.1.1, testo consolidato al 2022, come valori corretti per il recupero quando il laboratorio ha riportato un recupero fuori dall'intervallo indicato.

Tabella 4. Risultati dei laboratori e relativi z-score e ζ -score. PT ISS 2021 AFM1

Cod. LAB	Replica 1			Replica 2			U estesa
	$\mu\text{g/kg}$	z-score	ζ -score	$\mu\text{g/kg}$	z-score	ζ -score	$\mu\text{g/kg}$
Campione A							
3	0,041	0,4	0,7	0,041	0,4	0,7	0,011
4	0,036	-0,1	-0,3	0,037	0,0	0,0	0,007
5	0,034	-0,3	-1,4	0,033	-0,4	-1,8	0,004
6	0,037	0,0	0,0	0,037	0,0	0,0	0,003
7	0,037	0,0	0,0	0,038	0,1	0,1	0,014
9	0,043	0,6	//	0,04	0,3	//	//
11	0,035	-0,2	//	0,034	-0,3	//	//
12	0,033	-0,4	-2,3	0,035	-0,2	-1,2	0,003
13	0,035	-0,2	-0,6	0,037	0,0	0,0	0,007
14	$\leq 0,03$	(proxy -0,8)	//	$\leq 0,03$	(proxy -0,8)	//	//
15	0,036	-0,1	//	0,036	-0,1	//	//
16	0,050	1,4	1,0	0,060	2,5	1,7	0,027
17	0,052	1,6	3,9	//	//	//	0,0075
18	0,025	-1,3	-2,6	//	//	//	0,009
19	0,022	-1,6	//	0,028	-1,0	//	//
20 A	0,040	0,3	//	0,040	0,3	//	//
20 B*	0,043	0,6	//	0,040	0,3	//	0,011
21	0,035	-0,2	//	0,034	-0,3	//	//
22	0,03784	0,1	0,2	0,03726	0,0	0,0	0,0103
23	0,032	-0,5	-0,7	0,033	-0,4	-0,6	0,014
24	0,043	0,6	0,6	//	//	//	0,020
25 A	0,030	-0,8	//	0,0371	0,0	//	//
25 B*	0,0349	-0,2	-0,7	0,0360	-0,1	-0,3	0,0062
26	0,035	-0,2	-0,8	0,035	-0,2	-0,8	0,005
27	0,042	0,5	0,9	0,042	0,5	0,9	0,011
28	$>0,03$	-	//	$>0,03$	-	//	//
Campione B							
3	0,071	0,5	1,4	0,073	0,7	1,8	0,011
4	0,066	0,2	0,5	0,060	-0,2	-0,4	0,012
5	0,064	0,1	0,2	0,062	0,0	-0,1	0,008
6	0,052	-0,7	-3,8	0,048	-0,9	-5,1	0,005
7	0,065	0,1	0,2	0,065	0,2	0,3	0,017
9	0,072	0,6	//	0,074	0,7	//	//
11	0,071	0,5	//	0,076	0,9	//	//
12	0,048	-1,0	-4,0	0,051	-0,7	-3,1	0,007
13	0,061	-0,1	-0,8	0,062	0,0	-0,2	0,004
14	$0,03 < X \leq 0,05$	(proxy -0,8)	//	$0,03 < X \leq 0,05$	(proxy -0,8)	//	//
15	0,065	0,1	//	0,063	0,0	//	//
16	0,063	0,0	0,0	0,052	-0,7	-0,8	0,027
17	0,061	-0,1	-0,4	//	//	//	0,0087
18	0,059	-0,3	-0,6	//	//	//	0,014
19	0,050	-0,8	//	0,054	-0,5	//	//
20 A	0,071	0,5	//	0,074	0,7	//	//
20 B*	0,078	0,9	//	0,059	0,2	//	0,019
21	0,060	-0,2	//	0,056	-0,4	//	//
22	0,06022	-0,2	-0,3	0,05591	-0,4	-0,8	0,01585
23	0,067	0,3	0,3	0,066	0,2	0,2	0,029
24	0,066	0,2	0,2	//	//	//	0,030
25 A	0,0627	0,0	//	0,0566	-0,4	//	//
25 B*	0,0584	-0,3	-0,9	0,0575	-0,3	-1,0	0,0102
26	0,060	-0,2	-1,5	0,064	0,1	0,7	0,003
27	0,069	0,4	0,7	0,066	0,2	0,4	0,018
28	$>0,03$	-	//	$>0,03$	-	//	//

* risultato del laboratorio riferito all'analisi condotta in HPLC

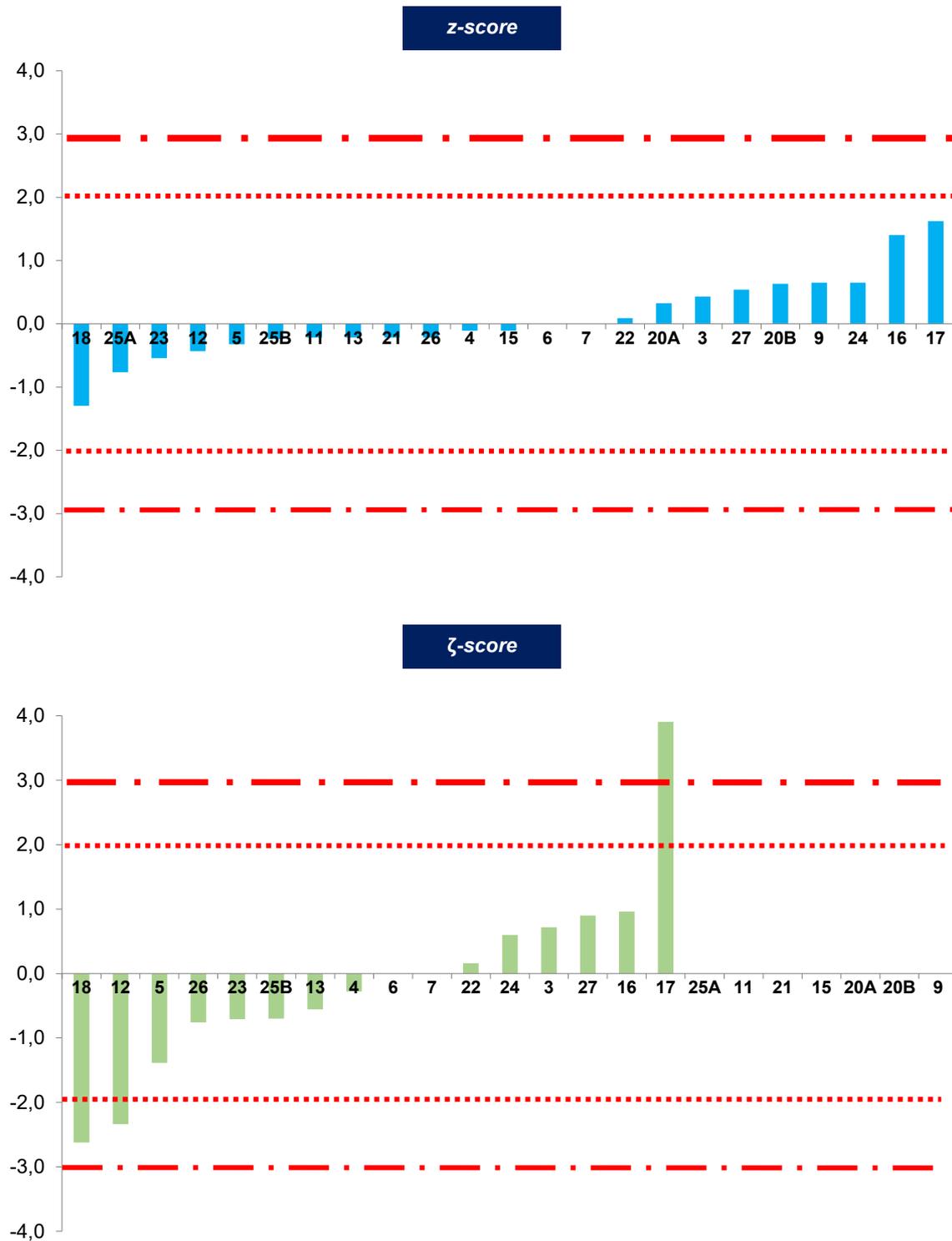


Figura 3. CAMPIONE A, replica 1: z-score e ζ-score per AFM1 in campione di latte liofilizzato (valore di consenso ± U(x) = 0,037 ± 0,002 µg/kg; σPT = 0,009 µg/kg. PT ISS 2021 AFM1)

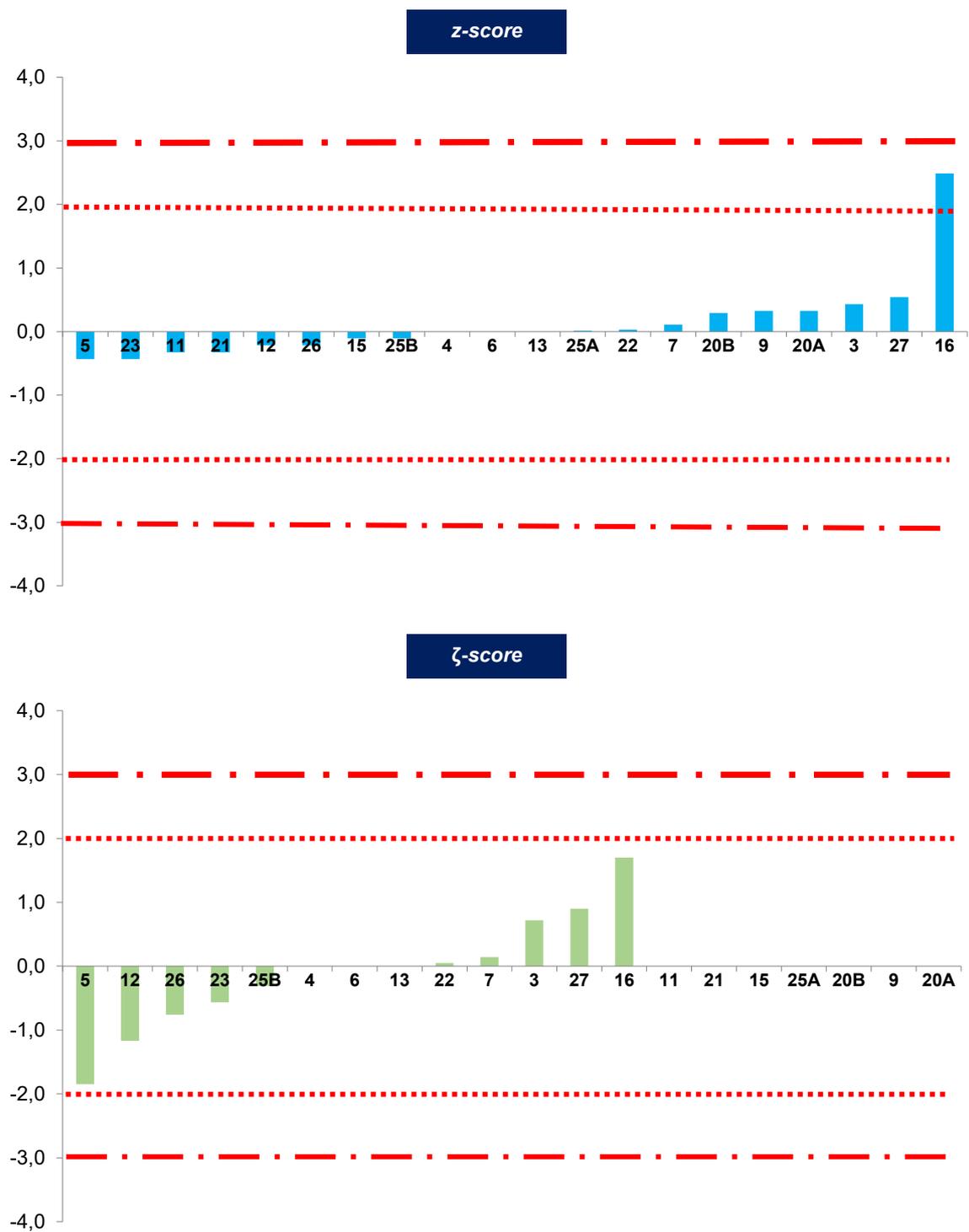


Figura 4. CAMPIONE A, replica 2: z-score e ζ-score per AFM1 in campione di latte liofilizzato (valore di consenso ± U(x) = 0,037 ± 0,002 µg/kg; σPT = 0,009 µg/kg. PT ISS 2021 AFM1)

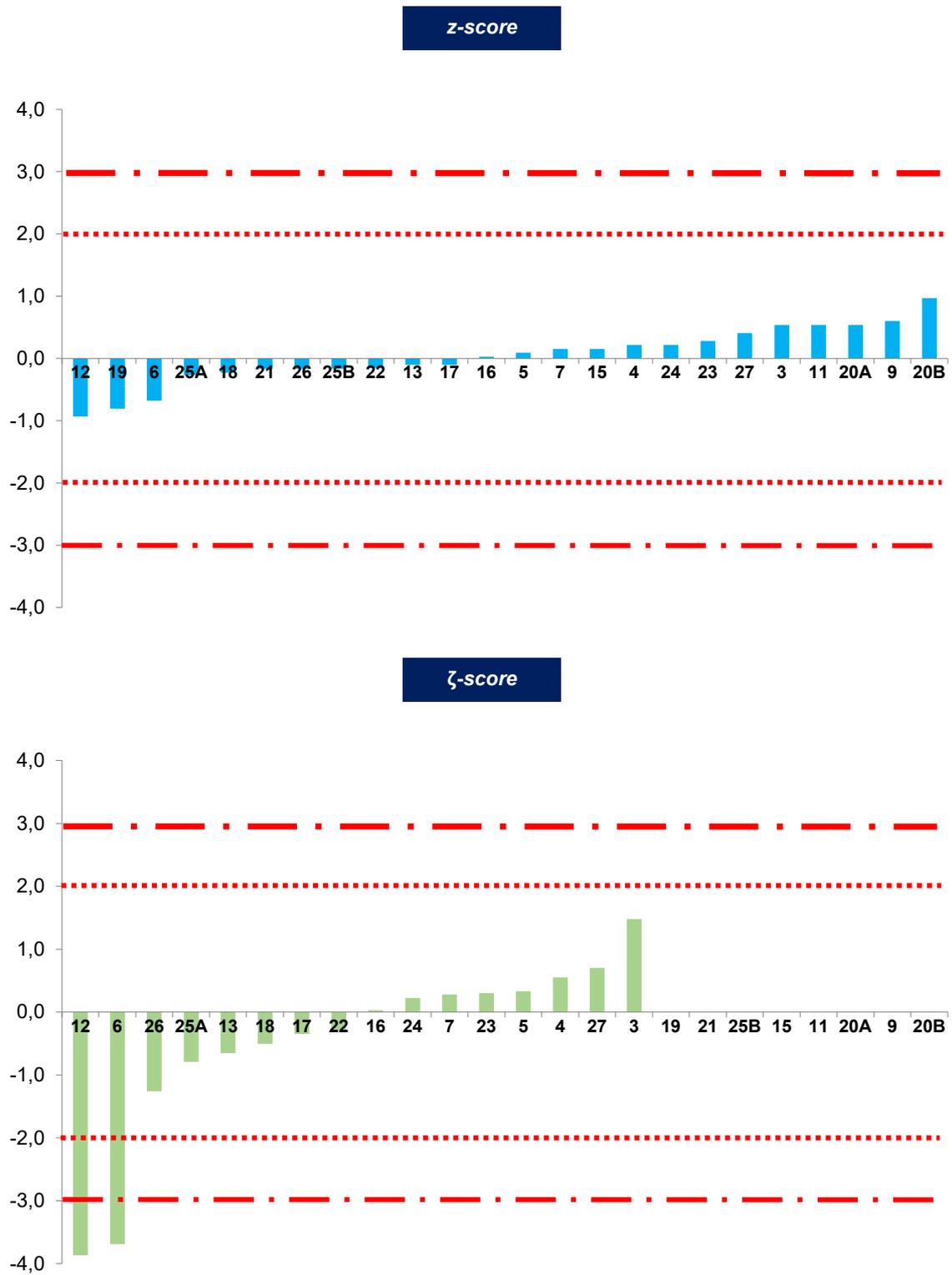


Figura 5. CAMPIONE B, replica 1: z-score e ζ -score per AFM1 in campione di latte liofilizzato (valore di consenso $\pm U(x) = 0,063 \pm 0,003 \mu\text{g}/\text{kg}$; $\sigma_{PT} = 0,016 \mu\text{g}/\text{kg}$). PT ISS 2021 AFM1

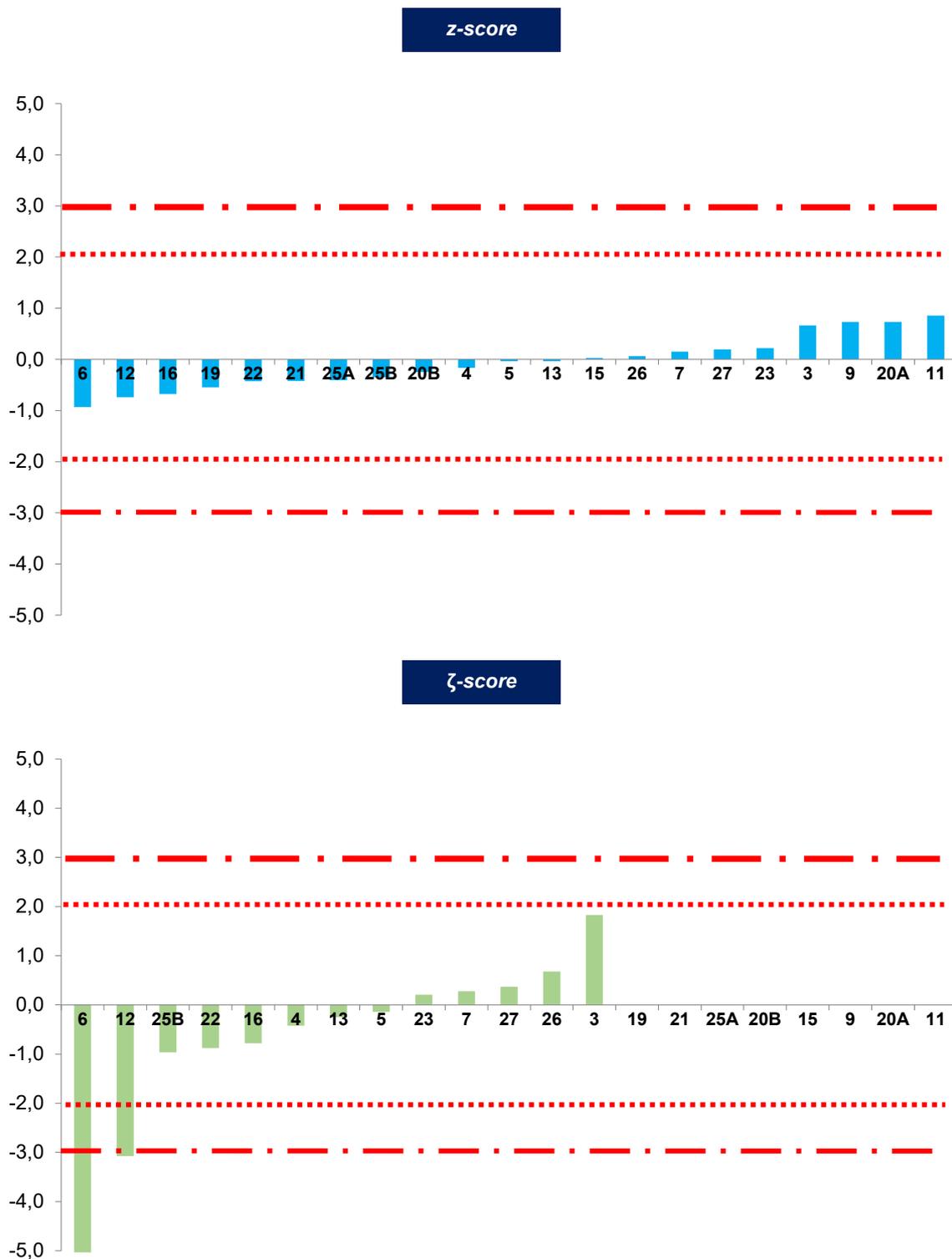


Figura 6. CAMPIONE B, replica 2: z-score e ζ -score per AFM1 in campione di latte liofilizzato (valore di consenso $\pm U(x) = 0,063 \pm 0,003 \mu\text{g}/\text{kg}$; $\sigma_{\text{PT}} = 0,016 \mu\text{g}/\text{kg}$). PT ISS 2021 AFM1

La *performance* quantitativa è stata valutata attraverso lo *z-score*. Il *proxy-z-score* è stato invece utilizzato per valutare i risultati consegnati come riportato con la dicitura “al di sotto del LOQ” (“<LOQ” o “<x µg/kg”, con specifica del valore). I risultati individuali per i singoli campioni, in termini di *z-score* e ζ -score, sono sempre riportati nelle tabelle 4a e 4b. I valori al di fuori dell’intervallo “Soddisfacente” (cioè $|z| > 2$ e $|\zeta| > 2$) sono riportati in grassetto.

Nell’elaborazione statistica iniziale dei risultati non si sono evidenziati *outlier* per nessuna delle repliche. Per quanto riguarda i punteggi di *z-score*, le prestazioni dei laboratori per le singole repliche di ogni campione sono state molto soddisfacenti. Nessun laboratorio ha dato punteggio di $|z| > 3$. Più nel dettaglio, per il campione A, dei 24 laboratori partecipanti il 100% delle prestazioni sono state soddisfacenti per il replicato 1 e, dei 21 laboratori, il 95% delle prestazioni sono state soddisfacenti per il replicato 2 (laboratorio 16 ha ottenuto uno *z-score* di 2,5). Per il campione B, il 100% delle prestazioni dei 24 laboratori sono state soddisfacenti per i due replicati.

Il 100% dei laboratori ha prodotto prestazioni soddisfacenti in termini di *z-score* per entrambi i campioni, quando sono state considerate le medie dei campioni replicati.

Il *proxy-z-score* è stato calcolato per il laboratorio 14 che non ha consegnato risultati quantitativi sia per il campione A che B. Sia il replicato 1 che il replicato 2 del campione A e del campione B hanno ottenuto il punteggio di *proxy-z-score* di segno negativo (-0,8). Le informazioni che si possono dare in merito sono che, in base al valore assegnato e al risultato fornito, il risultato con *proxy-z-score* $\leq |2|$ non può essere classificato come falso negativo. Il laboratorio 28 avendo consegnato un risultato nella forma “> x µg/kg”, non può essere considerato nel *proxy-z-score*.

Per quanto riguarda lo ζ -score, per il campione A, 16 laboratori hanno fornito una misura di incertezza estesa valida per il replicato 1 e di questi l’81% ha dato prestazioni soddisfacenti, per contro 2 laboratori (18 e 12) hanno dato un punteggio fra $2 < |\zeta| < 3$ e un laboratorio (17) ha dato $|\zeta| > 3$. Sempre per il campione A, 13 laboratori hanno fornito una misura di incertezza estesa valida per il replicato 2 e di questi il 100% ha dato prestazioni soddisfacenti. Per il campione B, 16 laboratori hanno fornito una misura di incertezza estesa valida per il replicato 1 e di questi l’88% ha dato prestazioni soddisfacenti e 2 laboratori (6 e 12) hanno dato $|\zeta| > 3$. Sempre per il campione B, 13 laboratori hanno fornito una misura di incertezza estesa valida per il replicato 2, di questi l’85% ha dato prestazioni soddisfacenti e 2 laboratori (6 e 12) hanno dato $|\zeta| > 3$.

Il problema di punteggio non soddisfacente di ζ -score fa ipotizzare che l’incertezza estesa del metodo associata al campione non sia adeguata, plausibilmente per la non inclusione di significative fonti di incertezza comportando che l’intervallo definito dal valore del laboratorio e della sua incertezza estesa ($x_{lab} \pm U_x$) non include il valore assegnato \bar{x} .

Nell’Appendice D, infine, sono riportati gli istogrammi relativi all’elaborazione delle statistiche di Mandel. Si confermano buone prestazioni della maggioranza dei laboratori partecipanti che nell’analisi dei replicati hanno dimostrato buoni risultati di precisione (nel confronto fra lo scarto tipo di ripetibilità del singolo laboratorio con lo scarto tipo di tutti i laboratori) e di accuratezza (nel confronto fra la media del singolo laboratorio con il valore medio di tutti i laboratori). Infatti, al confronto con i valori di h-crit = 1,899 e k-crit = 1,937 calcolati, solo pochi laboratori registrano degli indici di h o k non soddisfacenti. Nello specifico si osserva che il laboratorio 16 per il campione A supera entrambi i valori critici di h e di k, come conseguenza di uno scostamento della media del laboratorio dalla media generale superiore al criterio fissato e di uno scarto tipo del laboratorio più alto rispetto a quello calcolato come varianza media ponderata di tutti i laboratori.

CONCLUSIONI

In conclusione il PT è stato giudicato positivamente sia in termini di risultati che in termini di partecipazione con 24 partecipanti che hanno inviato i loro risultati. I partecipanti coinvolti sono laboratori del controllo ufficiale ed altri laboratori inclusi nella rete del Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte Bovino.

Per quanto riguarda i risultati, più del 95% dei risultati sono soddisfacenti in termini di *z-score* ≤ 2 , mentre per lo ζ -score dall'81% al 88% dei laboratori mostra risultati soddisfacenti, con il 100% di $|\zeta| \leq 2$ nel campione A replica 2.

Gli *z-score* calcolati sul valore medio dei risultati mostrano il 100% di esiti soddisfacenti per i due campioni e gli ζ -score mostrano un 88% di laboratori con $|\zeta| \leq 2$. Le prestazioni soddisfacenti in termini di *z-score* non richiedono alcun follow-up per lo studio.

Le prestazioni dei laboratori sono riassunte in Tabella 5.

Tabella 5. Riassunto dei dati relativi al prova valutativa sul latte liofilizzato. PT ISS 2021 AFM1

Analita/ Campione	Replica	N. totale <i>z-score</i>	N. $ z \leq 2$	Risultati soddisfacenti $z \leq 2$ (%)	N. totale ζ -score	N. ζ -score $ \zeta \leq 2$	Risultati soddisfacenti $ \zeta \leq 2$ (%)
AFM1/ Campione A	replica 1	24	24	100	16	13	81
	replica 2	21	20	95	13	13	100
AFM1/ Campione B	replica 1	24	24	100	16	14	88
	replica 2	21	21	100	13	11	85
AFM1/ Campione A	media	24	24	100	16	14	88
AFM1/ Campione B	media	24	24	100	16	14	88

BIBLIOGRAFIA DI RIFERIMENTO

- Analytical Methods Committee. Report on an experimental test of “recommendations for the conduct and interpretation of co-operative trials”. *Analyst* 1989;114:1489-95.
- Analytical Methods Committee. Robust statistics-how not to reject outliers Part 1. Basic Concepts. *Analyst* 1989;114:1693-97.
- Analytical Methods Committee. Robust Statistics-How not to reject outliers Part 2. Interlaboratory trials. *Analyst* 1989;114:1699-1702.
- EFSA (European Food Safety Authority). Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal* 2020,18(3):6040.
- EURL-MP-background doc_002 v1, 2019, Follow-up protocol – Protocol for management of underperformance in proficiency testing or lack of collaboration of NRLs. EURL mycotoxins & plant toxins, Wageningen Food Safety Research (WFSR), part of Wageningen University & Research. EURL https://www.wur.nl/en/show/EURL-MP-background-doc_002-Follow-up-protocol-v1.htm
- Europa. Regolamento (CE) 401/2006 della Commissione del 23 febbraio 2006. *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea* L 070 del 9 marzo 2006.
- Europa. Regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio del 15 marzo 2017. *Gazzetta ufficiale dell'Unione Europea* L95 del 7 aprile 2017.
- Fearn T, Thompson M. A new test for “sufficient homogeneity”. *Analyst* 2001;126:1414-7.
- Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS®). Protocol for the Organization and Analysis of Data, 6th Edition. 2002.
- IARC. *Aflatoxins. Chemical Agents and Related Occupations. A review of Human Carcinogens*. Lyon: International Agency for Research on Cancer Press, 2012. p. 225–248 (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 100F).
- ISO 13528:2015. *Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparison*. Geneva: International Organization for Standardization; 2015.
- Kuiper-Goodman T. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1990;68(7):1017-24. doi.org/10.1139/y90-155.
- McClure FD. A statistical model to evaluate analyte homogeneity for a material. *Journal of AOAC International* 2001;84(3):31-6.
- Thompson M, Ellison S, Wood R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure Appl Chem* 2006;78(1):145-196.
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018. *Requisiti di prova per la competenza dei laboratori di prova e taratura*. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2018
- UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010. *Valutazione della conformità – Requisiti generali per prove valutative interlaboratorio*. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2010.

APPENDICE A
Arruolamento dei laboratori

A1. Fac-simile lettera di invito ai Laboratori

Al Responsabile della Sezione Chimica
Al Direttore Sanitario
Denominazione
Indirizzo
CAP – Città – Sigla Provincia

Oggetto: Confronto inter-laboratorio ai fini di prova valutativa (PT2021/1).
Determinazione di AFM1 in latte

Caro collega,

nell'ambito delle proprie attività, il Laboratorio Nazionale di Riferimento per le micotossine e il Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte Bovino organizzano il confronto inter-laboratorio per la determinazione di **Aflatossina M1 (AFM1)** in **latte liofilizzato**, allo scopo di fornire ai partecipanti l'opportunità di valutare le proprie prestazioni e documentare la propria competenza.

La partecipazione è offerta a titolo gratuito ai laboratori incaricati del controllo ufficiale sugli alimenti, che, in base al Regolamento (UE) 2017/625, sono chiamati a partecipare ai test comparativi organizzati dal laboratorio nazionale di riferimento.

La registrazione al PT deve essere effettuata compilando la scheda allegata da inviare **entro il 15/07/2021** al seguente indirizzo **lnr-micotossine-tvn@iss.it** / **crn.qualita.latte@izsler.it**

In allegato trovate le condizioni per la partecipazione alle Prove Valutative.

I campioni per la prova sono costituiti da latte liofilizzato; i partecipanti riceveranno complessivamente circa **4 g** di latte ricostituito che saranno inviati ai partecipanti entro il **15/08/2021**.

La scadenza per l'invio dei risultati è prevista per **15/11/2021**.

Per ulteriori domande/informazioni non esitate a contattarci.

Ringraziandovi per la collaborazione inviamo cordiali saluti.

P. Daminelli
*per il Centro di Referenza Nazionale
per la Qualità del Latte Bovino*

B. De Santis
*per il Laboratorio Nazionale di Riferimento
per le micotossine*

A2. Fac-simile di scheda di partecipazione

SCHEDA DI PARTECIPAZIONE al PT per la determinazione di AFM1 in matrice latte liofilizzato
--

Confronto inter-laboratorio ai fini di prova valutativa (PT2021/1). Determinazione di AFM1 in latte

Persona di contatto:

E-mail:

Istituto/Dipartimento/Reparto:

Tecnica analitica con cui partecipi alla prova:

Accetto le condizioni di partecipazione seguendo le indicazioni della lettera che accompagnano questa scheda di partecipazione.

[Nome e cognome]

[Data e firma]

Ti preghiamo di firmare e restituire la scheda al lnr-micotossine-tvn@iss.it / crn.qualita.latte@izsler.it

La scadenza per l'invio dei risultati è prevista per **15/11/2021**.

P. Daminelli
*per il Centro di Referenza Nazionale
per la Qualità del Latte Bovino*

B. De Santis
*per il Laboratorio Nazionale di Riferimento
per le Micotossine*

A3. Laboratori registrati al PT

Nome dell'organizzazione	Contatto	Città
AAFGV - Associazione Allevatori del Friuli Venezia Giulia	Marco Tavano	Codroipo (UD)
Associazione Regionale Allevatori Veneto	Adriano Toffoli	Padova
ARAL Lombardia	Nicoletta Rizzi	Crema
Agenzia regionale per i servizi nel settore agroalimentare delle Marche	Donatella Bordoni	Jesi (AN)
Caseificio Sociale di Manciano s.c.a.r.l.	Fabiola Giannerini	Manciano (GR)
Granarolo SpA Laboratorio Centrale	Sara Bonora	Bologna
IZS-Abruzzo e Molise (G. Caporale)	Loredana Annunziata	Teramo
IZS-Lazio e Toscana	Carlo Boselli	Roma
IZS-Lazio e Toscana	Claudia Focardi	Firenze
IZS-Lazio e Toscana	Dario Deni	Grosseto
IZS-Lazio e Toscana	Katia Russo	Roma
IZS-Lazio e Toscana	Tiziana Galli	Latina
IZS-LER (Reparto Chimico, Lab. Micotossine)	Alberto Biancardi	Brescia
IZS-LER (Reparto Produzione Primaria)	Giorgio Zanardi	Brescia
IZS-LER (Reparto Chimico)	Elisabetta Caprai	Bologna
IZS-LER	Giuliana Cammi	Piacenza
IZS-Mezzogiorno	Mauro Esposito	Portici (NA)
IZS-Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta	Francesca Martucci	Torino
IZS-Puglia e Basilicata	Marilena Muscarella	Foggia
IZS-Puglia e Basilicata	Roldano Sottili	Putignano (BA)
IZS-Sardegna	Giannina Chessa	Sassari
IZS-Sicilia (Area Chimica e tecnologie alimentari)	Antonello Cicero	Palermo
IZS-Umbria e Marche	Ivan Pecorelli	Perugia
IZS-Venezie (Laboratorio Farmaci Veterinari e Ricerca)	Lidia Contiero	Legnaro (PD)
Veneto Agricoltura	Rita Dal Prà	Thiene (VI)
Parmalat Laboratorio Centrale	Claudia Vatteroni	Sala Bodanza (PR)
Laore Sardegna (ex Associazione Regionale Allevatori)	Ignazio Ibba	Oristano

APPENDICE B
Risultati sulle medie dei campioni A e B
del PT ISS 2021 AFM1

Tabella B1. Parametri relativi alla prova valutativa e numero dei risultati quantitativi e dei laboratori in ciascuna fascia di z-score e ζ -score. PT ISS 2021 AFM1

Parametro	AFM1 campione A	AFM1 campione B
\hat{x} , $\mu\text{g}/\text{kg}$ valore assegnato	0,037	0,063
u , $\mu\text{g}/\text{kg}$ incertezza del valore assegnato	0,001	0,002
σ_{PT} , $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,009	0,016
$u > 0,3 \sigma_{\text{PT}}$	no	no
σ_{rob} , $\mu\text{g}/\text{kg}$	0,005	0,007
σ_{rob} , %	13	12
z-score n. risultati quantitativi	24	24
$ z \leq 2$	24	24
$2 < z < 3$	0	0
$ z \geq 3$	0	0
ζ-score n. risultati quantitativi	16	16
$ \zeta \leq 2$	14	14
$2 < \zeta < 3$	1	0
$ \zeta \geq 3$	1	2

I valori numerici sono arrotondati.

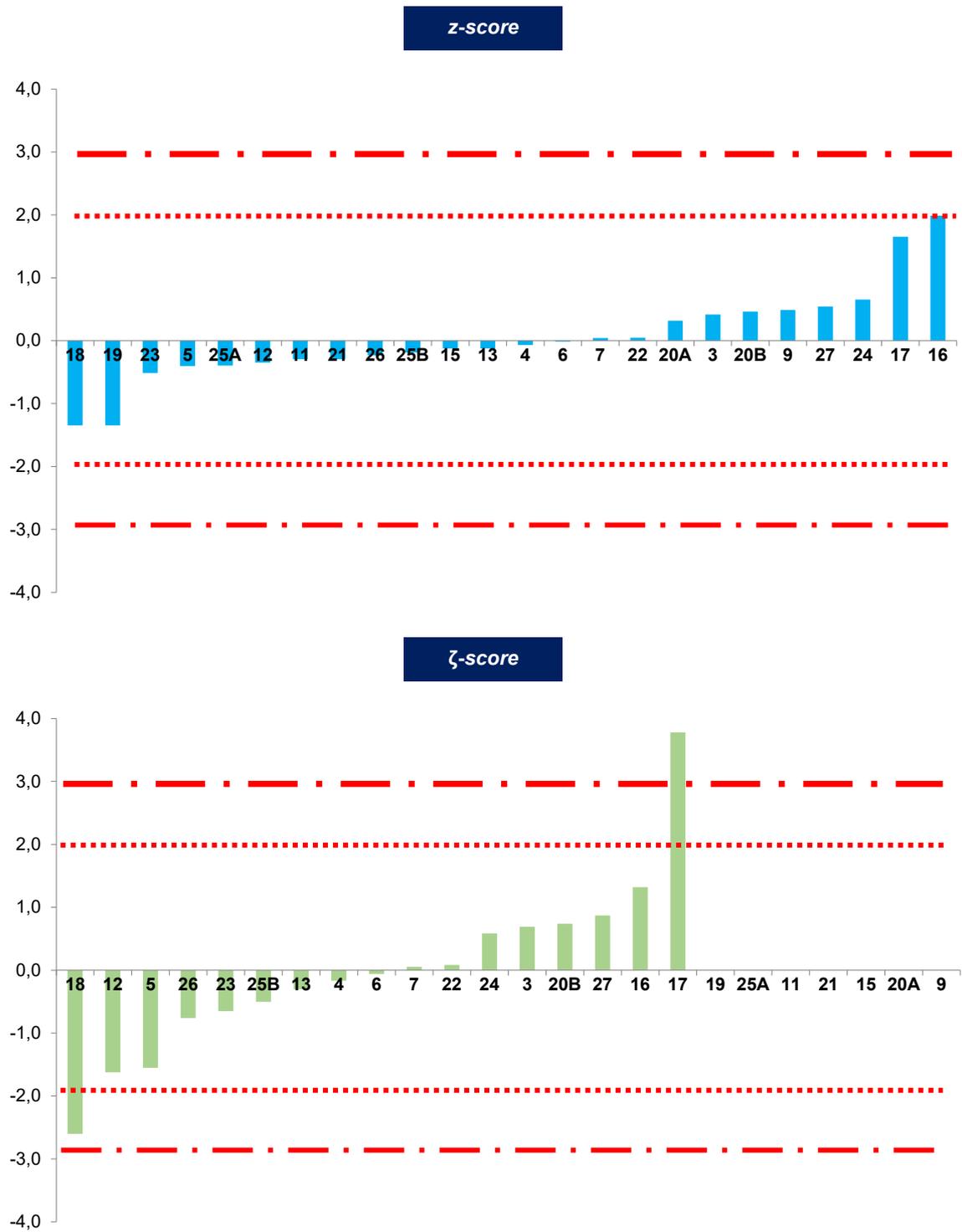


Figura B1. CAMPIONE A, valori medi: z-score e zeta-score per AFM1 in campione di latte liofilizzato (valore di consenso $\pm U(x) = 0,037 \pm 0,002 \mu\text{g}/\text{kg}$; $\sigma_{PT} = 0,009 \mu\text{g}/\text{kg}$. PT ISS 2021 AFM1)

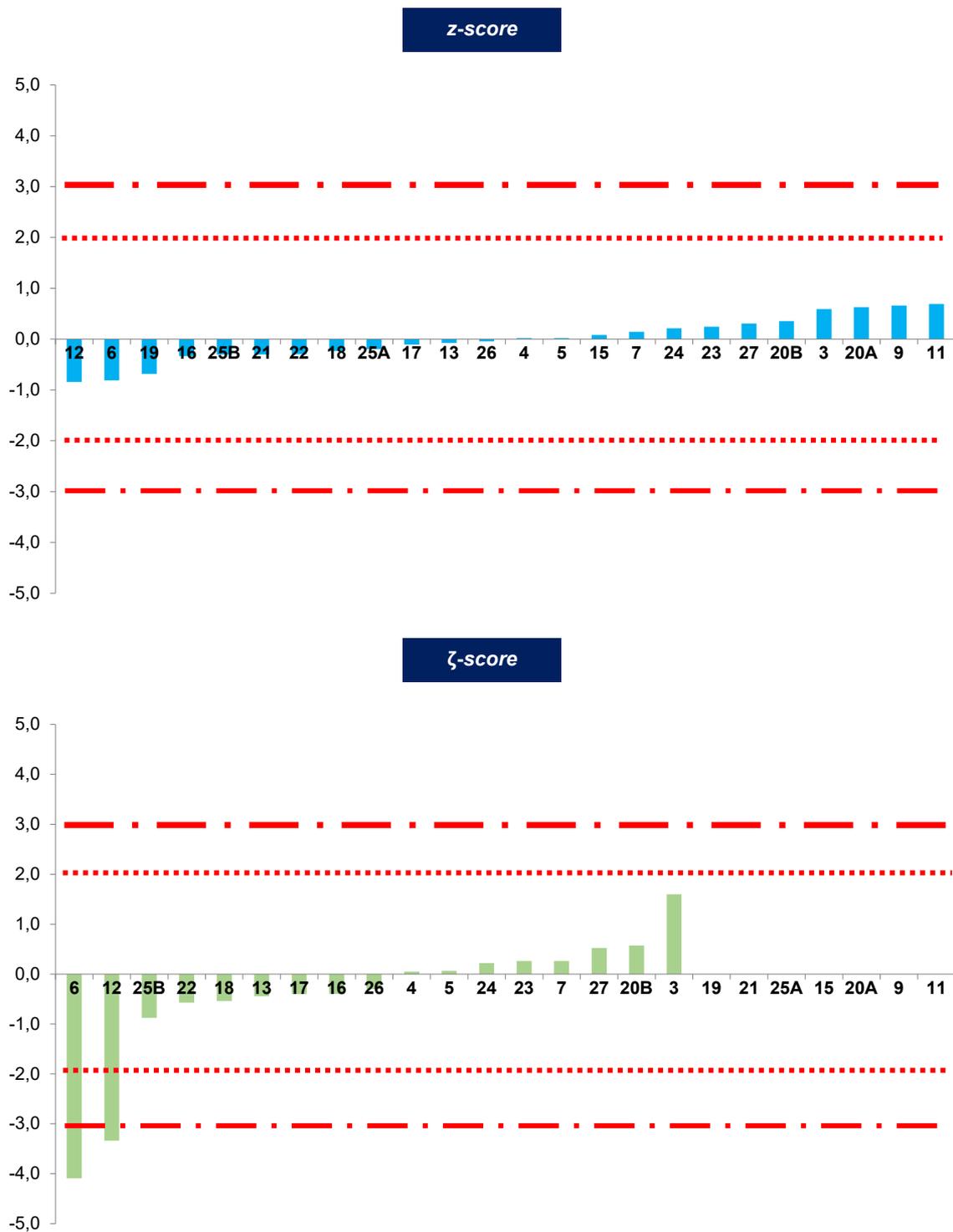


Figura B2. CAMPIONE B, valori medi: z-score e ζ -score per AFM1 in campione di latte liofilizzato (valore di consenso \pm U(x) = 0,063 \pm 0,004 μ g/kg; σ PT = 0,016 μ g/kg). PT ISS 2021 AFM1

APPENDICE C
Informazioni tecniche
sui metodi analitici dei partecipanti

Tabella C1. Scheda sintetica delle informazioni tecniche su metodi analitici dei partecipanti al PT ISS 2021 AFM1

Informazione	Codice Numero laboratorio
Metodo accreditato	
Si	3, 4, 5, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 28
No	6, 9, 19, 22, 26
Non indicato	17
Riferimento bibliografico	
UNI EN ISO 14675: 2003	3, 4, 7
ISO 14501: 2021	24
Metodo interno	5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28
Non indicato	25
Materiale di riferimento	
BIOPURE	16, 25
BCR	24
Fornitore kit	4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 21, 26
Standard interni	3, 19, 20, 23
Non indicato	18
Tipologia di metodo	
ELISA	3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28
HPLC	16, 17, 18, 20, 24, 25
ELISA kit	
Prognosis BIOTECH	3, 9, 15, 20, 22, 27
TecnaEurofins	4, 5, 6, 11, 12, 13, 23, 25, 26, 28
R-BiopharmRidascreen	7, 21
Tecna	14
Euroclone	19
Metodo HPLC	
Peso del campione (g)	
2	24
10	16, 18, 20
15	25
Procedura di estrazione	
Blender	24
Omogeneizzazione con solvente	16
Riscaldamento	25
Tipologia di estrazione	
Singola	16, 20, 24
Multiplo	
Non indicato	18, 25
Lavorazione campione	
Centrifugazione	16, 18, 20, 24, 25
Diluizione	24
Purificazione campione mediante	
SPE	16
IAC	18, 20, 24, 25
Fase mobile	
AcCN: H ₂ O (25:75)	16
AcCN: H ₂ O (30:70)	24
H ₂ O:AcCN:MeOH	18, 20
H ₂ O:MeOH	25
HPLC tipologia colonna	
C18	16, 24, 25
ZORBAX	18
HPLC rivelatore	
FLD	16, 18, 20, 24, 25

APPENDICE D
Rappresentazione grafica
dei valori degli indici h, k di Mandel
per i laboratori partecipanti

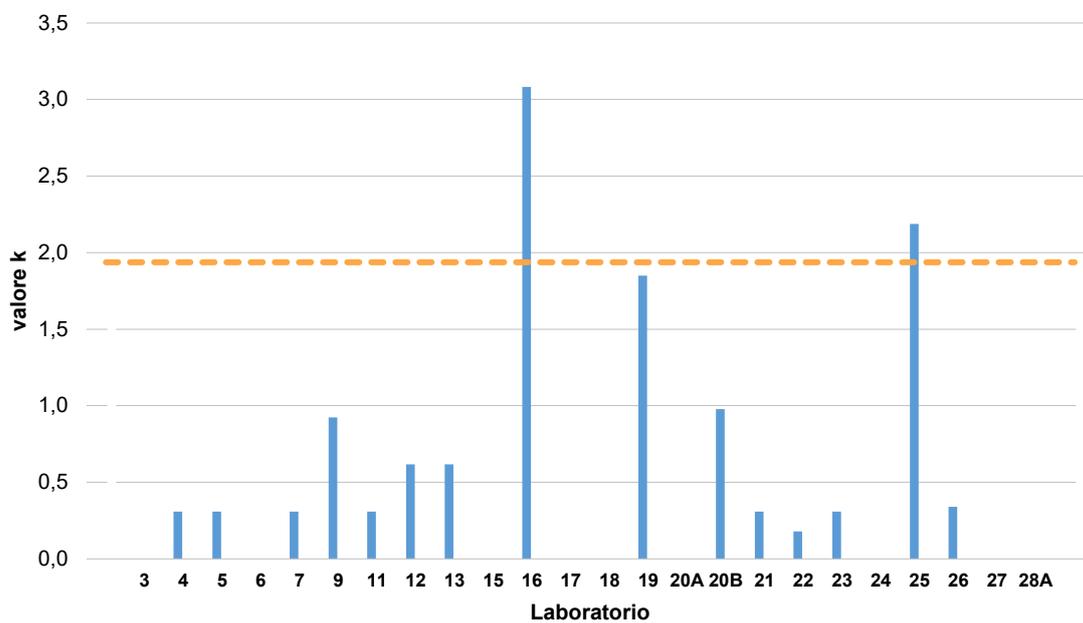
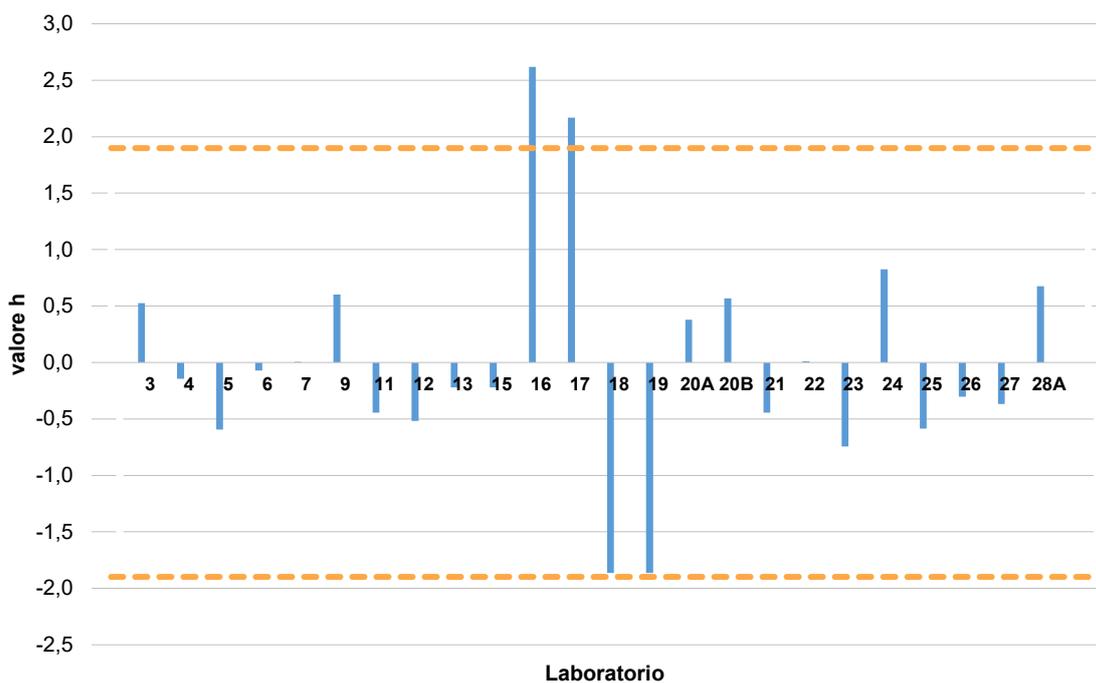


Figura D1. Campione A, replica 1 e 2: media = 0,037 µg/kg, |h-crit|=1,899 (α=0,05 e 22 gradi di libertà) e k-crit = 1,937 (α=0,05 e 20 gradi di libertà). PT ISS 2021 AFM1

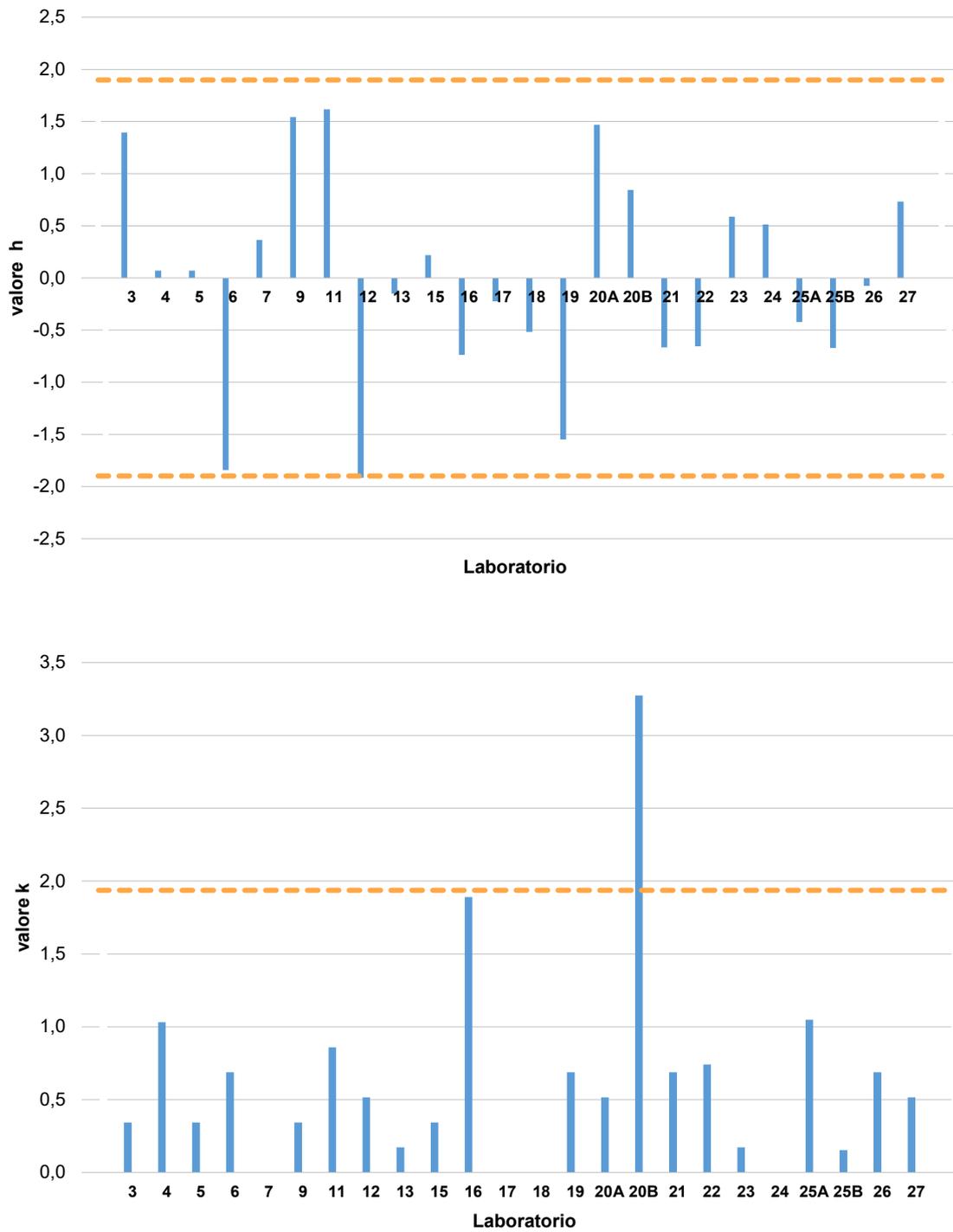


Figura 5. Campione B, replica 1 e 2: media = 0,063 µg/kg, |h-crit| = 1,899 (α=0,05 e 22 gradi di libertà) e k-crit = 1,937 (α=0,05 e 20 gradi di libertà). PT ISS 2021 AFM1

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre 2023, 1° Suppl.*

*Stampato in proprio
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, dicembre 2023