



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA**

(D.L.vo 30.06.1993 n. 270)

SEDE CENTRALE - 00178 Roma/Capannelle- Via Appia Nuova, 1411

Tel. (06) 79099.1 (centralino) - Fax (06) 79340724

<http://www.izslt.it>



Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del latte e dei Prodotti Derivati degli Ovini e dei Caprini (C.Re.L.D.O.C.)

Tel: 06/79099406 06/79340313

Fax 06/79340724

E-mail: creldoc@izslt.it

gilberto.giangolini@izslt.it

Alla c.a.

Laboratori latte IIZZSS

Roma, 30/11/2012

Oggetto: Risultati del Progetto “Conversione Unica Bactoscan FC per il Latte Ovino”

INTRODUZIONE

Le strumentazioni a cella di flusso, per la determinazione in automatico della carica batterica totale nel latte crudo, sono impiegate di routine nei principali laboratori che analizzano il latte. Dette strumentazioni consentono di ottenere un risultato in tempo reale. Il metodo ufficiale, che necessita di 72 ore, determina delle difficoltà riguardo all'esigenza di avere risultati per la valutazione del latte nel più breve tempo possibile.

Il dato fornito dalle apparecchiature automatiche espresso in impulsi (IBC), necessita però di una conversione in unità formanti colonia (UFC), unità di misura del metodo ufficiale EN/ISO 4833 “Microrganismi a 30°C”.

Il Reg. CE 1664/2006 nell'allegato VI BIS, per i metodi di prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente, prevede che per la determinazione della conta batterica totale si debba utilizzare il metodo ISO 4833:2003 “Microrganismi a 30°C”. Lo stesso regolamento consente l'impiego di metodi alternativi, che però devono essere validati in base alla ISO 21187:2004 – “Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results”.

La conversione viene calcolata quindi mediante confronto tra i risultati ottenuti con il metodo ufficiale e quelli con la strumentazione automatica Bactoscan FC (BFC).

La norma ISO 21187:2004 raccomanda che le prove siano condotte sullo stesso campione, nello stesso laboratorio e nello stesso tempo per ottenere la relazione più robusta. Raccomanda inoltre

di lavorare con campioni naturali, di evitare cambiamenti che possono avvenire nel tempo che intercorre dal campionamento all'analisi, dovuti al trasporto, all'agitazione e alla conservazione. Prevede inoltre che la normale procedura di analisi dei campioni per determinare la conversione sia simile alle procedure seguite durante il normale lavoro di routine e che per ogni metodo il campione debba essere analizzato in doppio.

Uno dei più importanti fattori che influenzano il risultato della carica batterica del latte nei due metodi è la diversa tipologia dei batteri presenti che può essere influenzata da temperatura, durata della conservazione, stagione di produzione, localizzazione geografica, eventuale presenza di conservante, tipologia di campionamento e trasporto.

Per quanto riguarda il metodo ufficiale in piastra è possibile una sottostima della carica batterica totale in quanto si contano le colonie che possono formarsi da aggregati batterici. Inoltre la temperatura di incubazione a 30°C seleziona in parte la crescita dei microrganismi presenti.

Nel latte ovino la presenza di diverse tipologie di batteri può essere influenzata anche dalle diverse condizioni di allevamento che possono verificarsi durante la lattazione. La partecipazione di diversi laboratori distribuiti in diverse località e l'analisi di campioni prelevati durante tutto l'arco della lattazione, permette di comprendere nella prova la maggior parte dei fattori che possono determinare cambiamenti nella flora microbica del latte ovino.

Nel presente documento vengono esposte le modalità operative ed i risultati ottenuti dal progetto "Conversione Unica Bactoscan FC per il Latte Ovino" svolto per arrivare alla determinazione di un'equazione unica per la determinazione della carica batterica totale nel latte crudo ovino con strumentazione automatizzata a cella di flusso.

LABORATORI PARTECIPANTI

- IZS Lazio e Toscana – Laboratorio di Roma
- IZS Lazio e Toscana – Laboratorio di Grosseto
- IZS Sicilia – Laboratorio di Palermo
- IZS Sardegna – Laboratorio di Sassari
- IZS Umbria e Marche – Laboratorio di Perugia

Punti principali del protocollo di analisi

Ogni laboratorio ha analizzato durante gli anni 2010-2011, campioni di latte di massa ovino, con le due metodiche.

- Utilizzo di campioni di latte di massa senza conservante
- Conservazione dei campioni a +4°C +/-2 fino al momento dell'analisi
- Analisi eseguite entro 24 ore dal prelievo
- Analisi dei campioni senza eseguire sub aliquote
- Analisi dei campioni con i due metodi a temperatura ambiente senza preriscaldamento
- Determinazione della carica batterica totale con BFC ed entro 10 minuti con il metodo di riferimento
- Analisi eseguite in doppio
- Per il metodo di riferimento in piastra la prova è stata eseguita allestendo 2 piastre per ogni diluizione
- Calcolo della media dei valori ottenuti con i due metodi
- Trasformazione in logaritmo dei risultati

Sono state stabilite preventivamente le percentuali orientative del numero di campioni da analizzare ai diversi livelli di impulsi.

Per la scelta di queste percentuali sono stati presi in considerazione anche i limiti di legge previsti per il latte ovino: 500.000 ufc/ml per il latte destinato alla produzione di prodotti a base di latte crudo e 1.500.000 ufc/ml per le altre produzioni.

Previsione delle percentuali di campioni da analizzare nelle diverse classi di impulsi:

Tab.1

Classi di impulsi Bactoscan (IBC/ μ L)	% campioni di latte
<100	7%
100-1000	20%
1000-2000	20%
2000-3000	20%
3000-5000	20%
5000-10000	10%
>10000	3%

Determinazione del numero dei campioni da analizzare

Come già detto la determinazione della carica batterica totale mediante l'apparecchiatura Bactoscan FC è influenzata da diversi fattori quali i tipi di batteri e la loro fase di crescita, le condizioni di conservazione, le influenze regionali, le condizioni di produzione e le influenze stagionali.

Il numero dei campioni analizzati deve essere sufficiente a rappresentare le variazioni che possono derivare dai fattori su esposti.

La norma stabilisce, considerando una regressione lineare, che il numero dei campioni di prova necessari può essere calcolato tramite la seguente equazione:

$$n = \left[\frac{t^2 \cdot (1 - r^2)}{(\delta^2 \cdot r^2)} \right] + 1$$

t = valore corrispondente alla distribuzione t-Student al livello di confidenza del 95%

δ = valore dell'errore relativo alla regressione da stimare ($\delta=0,1$ è considerato appropriato dalla norma)

r = valore presunto del coefficiente di correlazione tra i risultati dei due metodi

Nel caso in cui il coefficiente di correlazione sia sottostimato è necessario inserire nei calcoli un numero maggiore di prove.

Nel presente lavoro il numero dei campioni utilizzati per il calcolo della regressione lineare è risultato idoneo rispetto a quanto previsto dalla norma.

BACTOSCAN FC

Ripetibilità dei conteggi BFC

La ripetibilità dei risultati dell'apparecchiatura è stata valutata per singoli livelli e per il totale dei campioni.

Il calcolo della deviazione standard di ripetibilità è stata eseguita in base alla ISO 8196-1:2000.

E' stato quindi calcolato lo scarto tipo delle differenze risultate dalle determinazioni eseguite in doppio:

$$S_r = \left(\frac{1}{2q} \cdot \sum_{i=1}^q w_i^2 \right)^{\frac{1}{2}}$$

q = numero campioni analizzati in doppio
 Sr = Scarto tipo delle differenze
 Wi = differenza assoluta tra le prove eseguite in doppio
 (Dati in log₁₀)

I risultati ottenuti, nelle diverse classi di impulsi, sono specificati nella seguente tabella:

Classi IBC _μ L	<100	101-500	501-1000	1001-2500	2501-3000	>5000	Totale
N° campioni	28	104	74	64	48	50	372
Ripetibilità Sr (log ₁₀)	0.05	0.04	0.03	0.04	0.02	0.03	0.04

Valori massimi attesi nei diversi range previsti per il latte bovino:

Classi IBC _μ L	10-50	51-200	>200	Intero range
Ripetibilità Sr (log ₁₀)	0.07	0.05	0.04	0.05

Il produttore dell'apparecchiatura Bactoscan FC prevede valori di ripetibilità per il latte bovino, non specificando valori per le altre tipologie di latte.

Il risultato ottenuto sull'intero range rientra comunque nel limite previsto per il latte bovino.

Campo di misura

Limite inferiore considerato: 8 IBC/μL.

Sono stati accettati conteggi fino a 50.000 IBC/μL.

(IBC = Impulsi Bactoscan)

METODO DI RIFERIMENTO (ISO 4833:2003 "Microrganismi a 30°C")

Accettabilità dei risultati del metodo di riferimento - Verifica della proporzionalità dei conteggi

I risultati dei conteggi delle piastre effettuate con il metodo di riferimento sono stati sottoposti a verifica del grado di accordo con il modello di distribuzione teorica.

Di seguito si riportano le espressioni utilizzate per tale verifica.

Sono state considerate le piastre con un numero di colonie compreso tra 10 e 300.

La linearità è stata valutata utilizzando la seguente formula:

$$G_{m-1}^2 = 2 * \left[\sum_{i=1}^m \left(c_i \ln \frac{c_i}{R_i} \right) - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right) \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^m c_i}{\sum_{i=1}^m R_i} \right) \right]$$

c_i

Numero delle colonie rilevate nella piastra

R_i

Quantità relativa di campione inoculata alla diluizione in esame.

I risultati sono proporzionali se la seguente espressione risulta soddisfatta:

$$G_{m-1}^2 \leq \chi_{g,l}^2 \text{ con g.l.} = n. \text{ diluizioni esaminate} - 1$$

Per la valutazione della dispersione dei risultati ottenuti nelle repliche della stessa diluizione è stato calcolato il valore di K_p

$$K_p = \frac{|C_1 - C_2|}{\sqrt{(C_1 + C_2)}}$$

C_1 e C_2 = Valore dei conteggi nelle due repliche

Si riportano di seguito i criteri di accettabilità della dispersione dei dati in funzione del valore di K_p

$K_p < 1,96$	La dispersione dei conteggi è accettabile
$1,96 < K_p \leq 2,576$	La dispersione dei conteggi è considerata critica
$K_p > 2,576$	La dispersione dei conteggi è inaccettabile

I campioni con valori critici e inaccettabili non sono stati inseriti nel calcolo della regressione.

CALCOLO DELLA CONVERSIONE

In base a quanto specificato dalla ISO 21187:2004, per il calcolo della relazione fra i due metodi, si è applicato un modello di regressione lineare.

Prima di procedere con i calcoli i risultati sono stati sottoposti alla verifica della presenza di dati anomali ed effettuata la media delle due repliche.

Per il calcolo della regressione lineare si è considerato come variabile dipendente (Y) il metodo di riferimento, espresso in ufc/ml e come variabile indipendente (X) il metodo di routine in validazione, espresso in IBC/ml. Questa scelta è prevista dalla ISO 21157 in considerazione del maggiore errore di ripetibilità del metodo di riferimento.

La relazione da adottare per il calcolo dei valori ufc stimati dal metodo di routine è:

$$\text{Log}_{10} \text{UFC} = a + b \cdot \text{Log}_{10} \text{IBC}$$

a = intercetta della retta di regressione

b = coefficiente angolare della retta di regressione

Outlier

Le medie dei risultati ottenuti sono stati analizzati per la verifica della presenza di outlier, in base a quanto specificato al punto 5.5.3 della ISO 21187:2004. Un outlier è definito come una coppia di dati estremi, che normalmente appaiono in modo casuale per meno del 1% dei casi. Per queste coppie di dati la deviazione assoluta differisce più di $2,58 \text{ Sy}_x$.

Questi outlier sono stati scartati e la regressione è stata ricalcolata.

(Sy_x = deviazione standard residua per i punti stimati dalla regressione)

INTERVALLO DI CONFIDENZA DELLA STIMA

In base a quanto ISO 16140 i limiti di confidenza per il valore stimato in UFC a partire da un punto "X" di BFC (metodo di routine) è espresso dalla relazione:

$$CL(\langle y_{U/L} \rangle) = a + bx \pm t s(\langle y \rangle)$$

$$\text{con } s(\langle y \rangle) = S_{y:x} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{N} + \frac{(x - \bar{x})^2}{(N-1) \cdot V_x}} > S_{y:x}$$

t = t di Student per un livello di confidenza α e N-2 gradi di libertà

N = numero di campioni utilizzati per stimare la regressione

V_x = varianza dei valori di x (metodo di routine, IBC) utilizzati per la stima della retta di regressione

S_{y:x} = errore residuo della regressione

La formula si può semplificare in quanto per un numero elevato di campioni il II e III membro sotto radice diventano trascurabili (t tende a 1,96 per p=95%):

$$CL(\langle y_{U/L} \rangle) = a + bx \pm 1.96 S_{y:x}$$

RISULTATI

Distribuzione dei campioni

I campioni esaminati sono stati in totale 375, quelli risultati idonei sono risultati 343.

L'eliminazione di 32 campioni ha determinato una lieve modifica delle percentuali programmate (tab. 2).

Nella seguente tabella sono descritte le distribuzioni percentuali dei 343 campioni che sono stati utilizzati per l'elaborazione della retta di regressione:

Tab.2

Classi di impulsi Bactoscan IBC/ μ L	% campioni di latte programmati	% campioni di latte eseguiti
<100	7%	7%
100-1000	30%	49%
1000-3000	30%	22%
3000-5000	10%	9%
5000-10000	10%	10%
10000-50000	3%	3%

La distribuzione in classi di u.f.c./ml è stata la seguente:

Classi di ufc/ml	Numero campioni	%
< 100.000	104	30
100.000-500.000	122	36
500.000-1.000.000	41	12
>1.000.000	76	22

STIMA DELLA RETTA DI REGRESSIONE

Per la determinazione della retta di regressione sono stati utilizzati 343 campioni. E' stata calcolata la regressione lineare tra gli Impulsi del BFC (x = Log BFC/ml) e la Carica Batterica in Piastra (y = Log UCF/ml). L'equazione di regressione ottenuta è stata la seguente:

$$\text{Log UFC/ml} = 1,0104 * \text{log BFC/ml} - 0,6381$$

Parametri della Regressione Lineare BFC/UCF

N°campioni	Correlazione (r)	R ²	Sy:x	Intercetta (Err.Std.)	Slope (Err.Std.)
343	0,85	0,72	0,41	0,202	0,0337

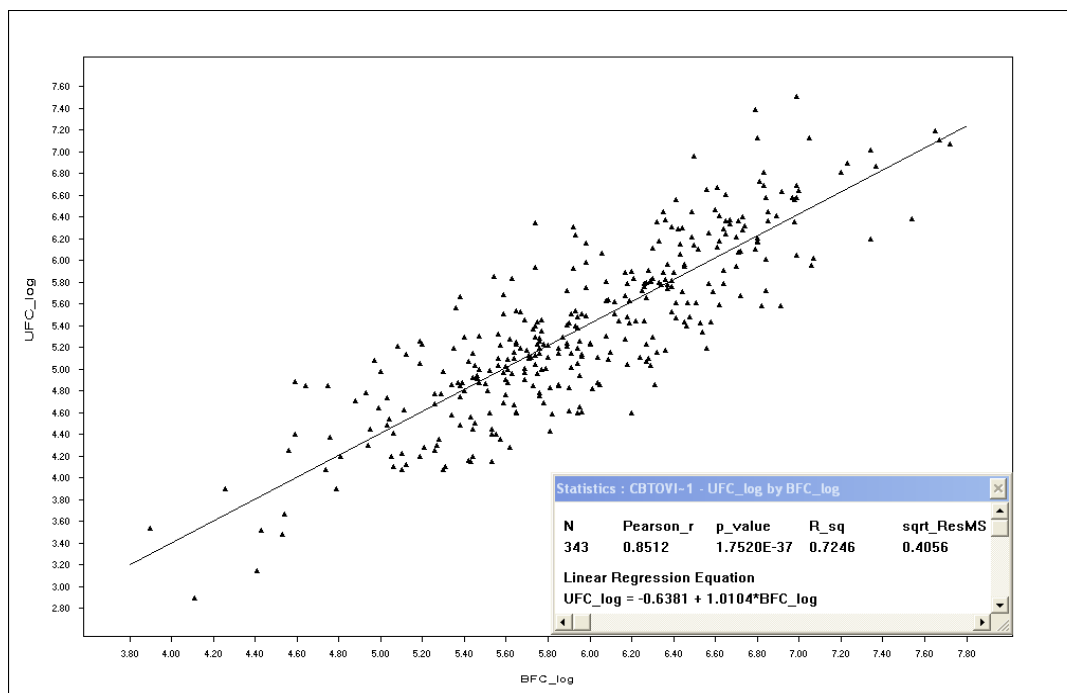


Fig.1 Diagramma di dispersione e retta di regressione tra log UFC/ml e log impulsi BFC/ml

L'esame della dispersione dei residui mostra un andamento normale:

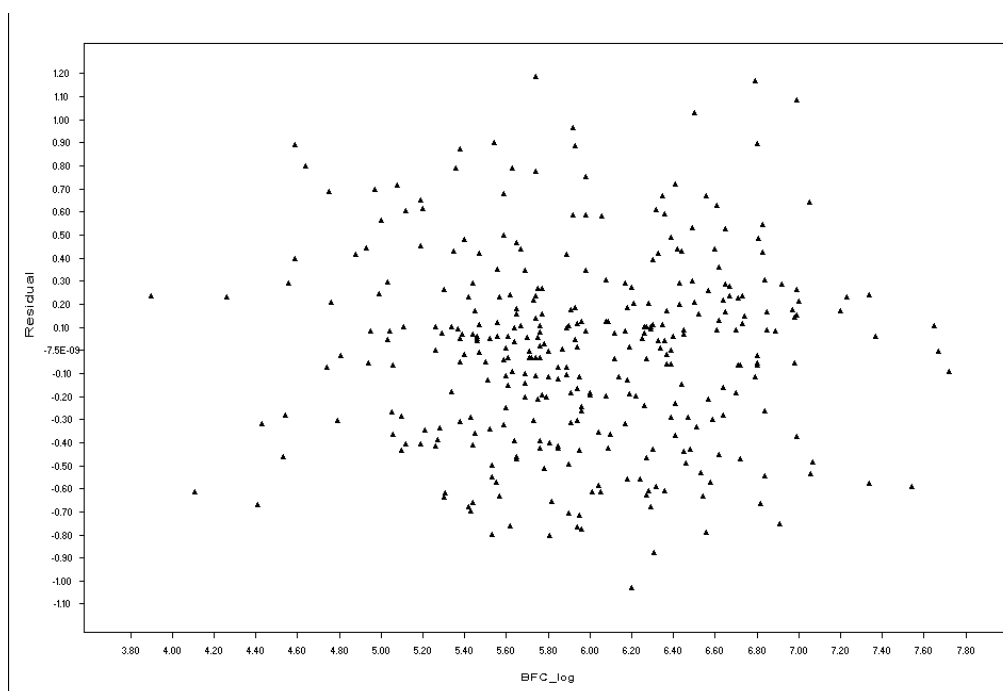


Fig.2 Diagramma di dispersione dei residui

CONSIDERAZIONI

Il problema della conversione del risultato della Carica Batterica Totale espressa tramite impulsi dalle apparecchiature a cella di flusso è discusso ormai da molti anni. Ogni laboratorio ha determinato la propria conversione o ha utilizzato quella elaborata da altri. Ciò ha determinato la presenza di differenti rette di regressione che determinano un risultato della carica batterica totale espressa in ufc/ml, diverso sullo stesso campione di latte, benché il numero di impulsi sia lo stesso. Risulta quindi importante l'adozione di una conversione comune che consenta di superare tale problema.

E' da considerare inoltre che una retta elaborata con campioni provenienti da diversi laboratori, diverse regioni e prelevati durante il periodo dell'intera lattazione consente di comprendere nel calcolo della conversione la maggior parte dei fattori che ne influenzano il risultato. Una conversione così calcolata potrebbe essere utilizzata anche da laboratori che non hanno partecipato al lavoro.

Per cercare di migliorare l'errore della stima si possono aggiungere, ai dati già considerati, i risultati derivanti dalla verifica periodica della conversione eseguita in tutti i laboratori che adotteranno la retta di regressione ottenuta.

Il presente lavoro oltre al calcolo della conversione prevede un successivo studio su come le diverse tipologie di batteri presenti nel latte ovino possano influenzare il risultato dei due metodi.

Riferimenti

- ISO 4833:2003 - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C.

- ISO 16140:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods.
- ISO 21187:2004 - Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results.
- ISO 7218:2007 – Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
- ISO 8196:2000 – Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis – Part1: Analytical attributes of indirect methods.