



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**

“BRUNO UBERTINI”
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

Via Bianchi, 9
25124 BRESCIA
Tel. 030-22901
Fax: 030-2290537

Pag. 1 di 10

Centro di Riferenza Nazionale Qualità latte Bovino

Tel. 030 / 2290541.

E-mail: crn.qualita.latte@bs.izs.it

Brescia 21/02/08

**NOTE APPLICATIVE PER IL PROGETTO DI UNIFICAZIONE DELLE MODALITA' DI
CONVERSIONE DEI DATI BACTOSCAN FC**

INTRODUZIONE E ASPETTI GENERALI

Il progetto è finalizzato alla raccolta ed elaborazione degli esiti ottenuti da più laboratori confrontando gli Impulsi Bactoscan FC con le Unità Formanti Colonia ottenute dal metodo della semina in piastra, su campioni di latte crudo vaccino rappresentativo di diverse realtà territoriali. Obiettivo finale è quello di proporre una modalità di conversione unica per i Laboratori della rete degli I.ZZ.SS.. Considerata l'adesione al progetto di laboratori “non IZS”, sarà comunque possibile proporre tale modalità di conversione come riferimento unico a livello nazionale. L'attività da svolgere non si configura come “validazione” del metodo indiretto, sebbene comprenda attività che possono far parte di un processo di validazione.

Le seguenti indicazioni operative fanno riferimento, prioritariamente, alla Norma ISO 21187 : 2004 (FIL 196) : “Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results”.

In linea generale vengono descritte alcune istruzioni pratico-applicative a completamento/chiarimento di quanto previsto da specifiche Norme Internazionali, ma per alcuni aspetti particolari vengono definiti anche aspetti alternativi, dettati di volta in volta da motivi di opportunità, necessità, scelte tecniche o organizzative specifiche del tipo di prova che si intende realizzare. Tutte le indicazioni applicative, anche quando in apparenza banali, trovano motivazione nella necessità prioritaria di garantire il maggior livello possibile di **uniformità** di comportamento tra laboratori che sono, in genere, caratterizzati da disponibilità, esperienza, prassi operative interne differenti. La decisione di realizzare sessioni di lavoro costituite da un numero molto limitato di campioni (2-4) risponde a questa finalità.

Non si è ritenuto necessario puntualizzare aspetti generali riguardanti ambiente, vetreria, manualità, apparecchiature di refrigerazione e incubazione, strumentario generico etc., per le quali l'applicazione di B.P.L. e l'Accreditamento dei laboratori partecipanti, costituiscono elementi di garanzia sufficienti.

Nota : il presente documento potrebbe contenere imprecisioni, dimenticanze o errori così come elementi interpretabili o in conflitto con situazioni operative ed esigenze di singoli laboratori ; in ogni caso si prega di contattare lo scrivente per concordare eventuali modifiche prima di applicarle..

1- TIPO E QUANTITA' DEI CAMPIONI

Ogni Laboratorio analizzerà un centinaio di campioni (non meno di 50, non più di 200) di **latte crudo vaccino di massa** aziendale, distribuiti in modo più o meno uniforme nell'arco dei trimestri 2008, scelti tra quelli “normalmente” conferiti e quindi, in linea di massima, provenienti da allevamenti dell'area geografica di competenza. I campioni vengono selezionati in modo da garantire la copertura dell'intero campo di misura del Bactoscan FC secondo la proporzione indicativamente illustrata in Tabella 1 e comunque dando preferenza al livello medio di contaminazione dei campioni normalmente analizzati da ciascun laboratorio.

Per definire preventivamente il livello di contaminazione batterica e quali diluizioni approntare è consigliabile eseguire **un'analisi preliminare al Bactoscan** .



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**

“BRUNO UBERTINI”

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

Via Bianchi, 9
25124 BRESCIA
Tel. 030-22901
Fax: 030-2290537

Pag. 2 di 10

Nota: la copertura dell'intero range è essenziale per la significatività dell'elaborazione finale dei dati. La maggior frequenza di campioni con contaminazione tipica della “zona territoriale” garantisce la rappresentatività del campione rispetto all'attività tipica di ciascun laboratorio. Infine la prevalenza di campioni a bassa contaminazione garantisce l'analisi di dati nella “zona critica” della conversione (e della rilevanza economica e legale del parametro carica batterica).

TAB.1 – Selezione dei campioni in funzione della contaminazione	
INTERVALLO IMPULSI	% sul totale dei campioni
0-20	3
21- 100	30
100-1000	30
1000-5000	25
5000-10000	4
10000-50000	4
50000- 99999	4

Sono da analizzare campioni **privi di conservante**, e ottenuti da latte **refrigerato** alla stalla (4-10 °C) . Nel caso non siano disponibili, il Laboratorio riporta nel Report finale (Foglio IBC, Colonna “Cons.”) a fianco di ciascun campione la sigla “C” nel caso di presenza di conservante e la sigla “NO” (Foglio IBC , colonna “Refrig.”) nel caso di campioni ritirati a temperature superiori a ai 10 °C. Il Laboratorio comunica inoltre *una tantum* il tipo e la concentrazione del conservante. E' concesso, occasionalmente, “**costruire**” il campione al fine di ottenere un livello di contaminazione desiderato (ad es. in mancanza di campioni da inserire nella prima o ultima classe). In tal caso, utilizzare per le diluizioni/contaminazioni unicamente latte crudo vaccino avendo cura che il latte aggiunto sia correttamente miscelato al fine di non modificare in modo significativo la composizione finale del campione che sarà sottoposto alla prova, rispetto a quella tipica del latte. Non vanno analizzati campioni macroscopicamente **alterati** (coagulati , presenza corpi estranei, sierati) o totalmente /parzialmente **congelati** .

Nota: al fine di minimizzare l'eventuale possibile trascinarsi tra campioni nell'analisi strumentale , si consiglia di analizzare nella medesima sessione di lavoro campioni con contaminazione batterica di simile livello (vedi Punto 7).

Punto Critico – Ogni laboratorio identifica i campioni della prova con **numero progressivo** (1-50; 1-100;1-200) e con la **data di analisi** (gg/mm/AA) (vedi anche Punto 10)

2- ALTRE ANALISI

Se per i campioni selezionati sono disponibili altri dati analitici riteniamo opportuno utilizzarli in sede di elaborazione. A tal fine è stato predisposto un foglio aggiuntivo nel Report finale (foglio “altri dati”) in cui mantenendo il medesimo identificativo del campione (compilazione automatica) possono essere riportati gli esiti analitici aggiuntivi e la segnalazione di eventuali composizioni anomale (nel campo “note” il Laboratorio segnalerà il giudizio di composizione anomale secondo i normali criteri utilizzati per annullare i campioni nella propria attività routinaria).

Nota: aldilà della individuazione delle composizioni anomale, utile in sede di elaborazione finale dei dati, riteniamo che la disponibilità di questi dati potrà consentire alcune valutazioni aggiuntive sulla determinazione della CBT che, pur non essendo compresi nelle finalità della presente prova, potrebbero essere di comune interesse.



3- CONSERVAZIONE E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

L'intervallo di tempo tra prelievo ed analisi dovrebbe essere contenuto entro le **36 ore**, preferibilmente entro 24 ore. Durante questo periodo i campioni devono essere conservati a temperatura di refrigerazione fino a poco prima dell'analisi (10-20 minuti).

Nota: non verrà valutata l'influenza del tempo intercorso tra mungitura ed analisi; si ritiene sufficiente che l'intervallo prelievo – analisi sia quello tipico dell'attività dei singoli laboratori .

La prova viene eseguita su campioni “**freddi**” (non pre-riscaldati) previa accurata agitazione. La prova è eseguibile anche su campioni previamente riscaldati e miscelati (42 °C) nel caso il Laboratorio applichi normalmente questa procedura per l'analisi della carica batterica. Resta inteso che, in questo caso, il prelievo dell'aliquota per le diluizioni verrà eseguito dopo il riscaldamento/miscelazione del campione e che per tutte le fasi successive si dovranno minimizzare i tempi di esecuzione. I laboratori segnalano *una tantum* allo scrivente la temperatura dei campioni analizzati.

Punto Critico – la **miscelazione del campione** (freddo o caldo) è determinante per l'esito della prova. Deve essere eseguita prima del prelievo dell'aliquota destinata alle diluizioni con movimenti lenti, regolari e ripetuti di rotazione e capovolgimento (indicativamente devono durare circa 15 secondi , la Norma 8261: prevede 25 capovolgimenti). Prolungare la miscelazione nel caso di campioni “molto pieni” o con evidenti segni di affioramento (tipico dei campioni freddi ad elevato tenore in grasso). Deve essere evitata l'agitazione vigorosa con formazione di schiuma (incrementa significativamente la disaggregazione degli ammassi batterici). La miscelazione dei campioni deve essere eseguita con modalità costante per tutti i campioni analizzati nel corso della prova.

Nota: si ritiene opportuno evitare la miscelazione con Stomacher o Vortex Mixer (del resto non usuali nei Laboratori in cui si determina la CBT con Bactoscan).

Il prelievo dell'aliquota per le diluizioni deve essere eseguito entro un limitato intervallo di tempo (indicativamente 1-2 minuti; la Norma ISO 8261 indica di non eccedere i 3 minuti) dopo la miscelazione. L'analisi al Bactoscan deve essere eseguita entro breve tempo dal prelievo dell'aliquota e deve essere preceduta da una breve e leggera **miscelazione aggiuntiva** (a supporto di quella eseguita dallo strumento) .

Nota : non si ritiene opportuno introdurre la suddivisione del campione in 2 aliquote da destinare ai due metodi di analisi ad evitare una possibile fonte di variabilità ; il rispetto dei tempi delle varie fasi e la miscelazione del campione correttamente eseguita sono ritenuti idonei allo scopo.

Nota : non si ritiene necessario “sdoppiare” l'intero processo di esecuzione dell'analisi in piastra (prelievo dell'aliquota, diluizioni e semina) come previsto dalla Norma (considerata la finalità della prova e il già elevato livello di variabilità della metodica di riferimento).

D'altra parte si ritiene utile la semina in 2 piastre anche per i laboratori accreditati (Norma ISO 07218:2007) . .

4- DILUIZIONI DEI CAMPIONI

L'allestimento delle diluizioni, la semina in piastra ed il conteggio delle colonie sono da affidare a personale esperto (se possibile sempre lo stesso nell'arco dell'anno). Non si eseguiranno verifiche di riproducibilità tra operatori in quanto componente tipica del metodo della semina in piastra). Ogni sessione di lavoro deve comprendere un numero molto limitato di campioni (ottimale 2 , massimo 4) . Sono ovviamente eseguibili più sessioni di lavoro in un'unica giornata lavorativa. Vengono allestite diluizioni in **base 10** (1 ml + 9 ml) utilizzando vetreria sterile di capacità idonea (pipette 1 e 10 ml), provette sterili con tappo da almeno 15 ml .



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**

“BRUNO UBERTINI”

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

Via Bianchi, 9
25124 BRESCIA
Tel. 030-22901
Fax: 030-2290537

Pag. 4 di 10

Nota : si ritiene opportuno utilizzare unicamente pipette da 1 ml per le varie fasi di prelievo/diluizione/semina. La comodità di pipette di maggior portata (2 o 5 ml) comporta un incremento teorico dell'incertezza senza modificare sostanzialmente il carico di lavoro, considerato il numero di campioni da analizzare.

Nota : le pipette in vetro Classe A o B sono ovviamente da preferire; si considerano comunque idonee allo scopo pipette in plastica monouso in grado di garantire un'incertezza del volume non superiore al 5%, limite generalmente garantito dal materiale correntemente utilizzato (ISO 6887-I Punto 9.2)

Sono utilizzabili pro-pipette manuali o elettriche, purchè tarate e controllate, ed in grado di garantire livelli di incertezza del volume erogato paragonabile. La strumentazione utilizzata deve restare costante nell'arco dell'intera prova.

Le diverse fasi di diluizione e deposizione in piastra possono essere condotte sotto cappa o in alternativa con l'ausilio di “cabina protettiva da tavolo”. Si ritiene comunque idoneo allo scopo il lavoro svolto in presenza del solo becco Bunsen, in condizioni ambientali idonee.

Nota: si ritiene garantita e controllata la sterilità del materiale e sotto controllo le condizioni di contaminazione ambientale (aria e superfici di lavoro) dalle procedure operative attuate da ciascun laboratorio.

Allestire **almeno 3 diluizioni** per ciascun campione; la scelta dipende dal livello di contaminazione atteso (indicativamente da -1 a -3 per le bassissime contaminazioni ; da -2 a -4 per le medie e da -3 a -5 o -6 per le alte ed altissime).

Punto Critico : in ogni caso si richiede di allestire tutte le diluizioni in base 10 a partire dal Tal Quale indipendentemente da quelle che verranno poi utilizzate per la semina in piastra (non “saltare” alcun passaggio modificando le quantità diluente /diluito)

Nota: nel caso di campioni caldi è opportuno ridurre lo “shock termico” dei batteri nel passaggio dal latte alla soluzione Ringer mantenendo quest'ultima a temperatura ambiente per tempo congruo prima del prelievo. In ogni caso riteniamo opportuno evitare di utilizzare soluzioni riscaldate (37-40 °C) per quanto riguarda l'allestimento delle diluizioni .

Le provette contenenti i 9 ml di **Soluzione Ringer** ¼ sterile possono essere approntate anticipatamente, nell'arco della medesima sessione di lavoro.

Punto critico - ogni provetta, dopo l'inoculo e prima di prelevare l'aliquota per la diluizione successiva, viene sottoposta a breve (5 secondi) miscelazione con Vortex Mixer (in alternativa eseguire 2-3 cicli di riempimento/ svuotamento con la nuova pipetta prima del prelievo)

Punto critico - Porre particolare attenzione affinché lo scarico della pipetta nella nuova diluizione avvenga senza immersione della punta e delle pareti esterne, nel diluente. Inoltre evitare la “raccolta” del liquido residuo nella pipetta tramite contatto con le pareti o spinta (la taratura delle pipette è basata sullo scarico per caduta).

La deposizione di ciascuna diluizione nelle piastre può essere eseguita con la stessa pipetta che verrà poi utilizzata per costituire la diluizione successiva (con la medesima pipetta si esegue quindi l'eventuale avvinamento/miscelazione, poi il doppio prelievo di 1 ml da destinare alle piastre, e quindi il prelievo di 1 ml da scaricare nella provetta successiva) .

Nel caso si preferisca allestire le piastre in serie dopo la costituzione di tutte le diluizioni si può utilizzare la medesima pipetta purchè si inizi a prelevare l'aliquota da 1 ml destinata alle piastre dall'ultima diluizione allestita ed eseguendo un avvinamento prima del primo prelievo in ogni nuova diluizione.

Punto Critico - è importante che l'intervallo di tempo in cui l'aliquota di latte permane a contatto con il diluente (tanto nelle provette che nella piastra prima dell'aggiunta del terreno) sia contenuto, e soprattutto il più possibile uniforme tra i campioni di una medesima sessione di lavoro e tra



diverse giornate lavorative. Per il medesimo motivo la determinazione con il Bactoscan deve “coincidere” (+/- 10 minuti) con la fase in cui il terreno viene aggiunto alle piastre .

Nota: sono soprattutto questi gli aspetti che consigliano di eseguire sessioni di lavoro costituite da pochi campioni anche nei Laboratori in grado di fornire prestazioni decisamente più elevate nelle attività routinarie.

5- PREPARAZIONE E CONTROLLI DEL TERRENO E STRUMENTI

Per gli aspetti generali si vedano ISO /TS 11133-1 e ISO/TS 11133-2 . In ogni sessione di lavoro approntare 1 piastra di controllo “bianco” contenente terreno e liquido di diluizione quale verifica di contaminazioni estranee. In caso di crescita annullare le prove della sessione .

Nota : quando nella medesima giornata vengono realizzate più sessioni di lavoro realizzate in modo più o meno continuativo è possibile allestire “bianchi” ad inizio e fine giornata lavorativa ricomprendendo quindi nel controllo più sessioni .

Nota: si da per scontata l'esecuzione di controlli di qualità (sterilità e fertilità) di ciascun lotto di terreno in fase di produzione

Approntare per ogni diluizione **2 piastre** Petri (90 mm in plastica) con 15 +/- 1 ml di terreno.

Digerito enzimatico di caseina	5,0 g
Estratto di Lievito	2,5 g
Glucosio Anidro	1,0 g
Latte in polvere scremato (privo di S.I.)	1,0 g
Agar	9-15 g (potere gelificante)
Acqua	q.b.x 1 L
- pH dopo sterilizzazione a 121 °C x 15 minuti = 7,0 +/- 0,2 a 25 °C	
- Conservare al buio a 3 +/- 2 °C per al massimo 3 mesi	
- Fondere prima dell'uso, riportare a 44-47 °C prima del versamento in piastra	

6- ESECUZIONE DELLA SEMINA

Anche per la distribuzione del terreno sono utilizzabili strumenti automatici purchè controllati e tarati (ISO 835 e ISO 8655-1)

Punto Critico – la temperatura del terreno versato deve essere monitorata (troppo bassa non consente una diffusione omogenea dell'aliquota di campione e quindi delle colonie che si formeranno, troppo calda rischia di uccidere/stressare i microrganismi) è quindi opportuno mantenere il terreno in bagnomaria termostatao miscelandolo periodicamente. L'utilizzo di un termometro sterile immerso nel flacone (o in un flacone di controllo) può risultare utile quando le modalità di lavoro comportino frequenti e prolungate permanenze del terreno a temperatura ambiente. La Norma 4833 prevede una temperatura del bagnomaria di 44-47 °C ; considerata la limitata quantità di terreno che verrà utilizzata in ogni sessione di lavoro, si sottolinea la priorità di mantenere tale temperatura il più possibile vicina al limite inferiore (in pratica, si ritiene accettabile un temporaneo abbassamento al di sotto dei 44 °C mentre è da evitare un superamento dei 47 °C anche se occasionale). Non versare il terreno direttamente sopra l'inoculo depositato nella Piastra.

Punto critico - L'apertura delle piastre , per la deposizione della diluizione e per l'aggiunta del terreno, deve avvenire rapidamente e sollevando il meno possibile il coperchio al fine di ridurre l'esposizione all'aria.



Punto Critico - E' essenziale che la fase di **miscelazione delle piastre** sia effettuata immediatamente dopo la deposizione del terreno (prima che si avvii il suo indurimento), in modo completo (la piastra deve essere movimentata in senso orario ed antiorario , e orizzontale verticale per almeno due volte per ciascuna direzione) , uniforme (il movimento deve essere continuato e misurato per evitare sversamenti) , ripetitivo e costante (tutte le piastre vanno trattate allo stesso modo). Aumentare la durata di questa fase se le piastre non mostrano una crescita uniformemente diffusa. Ridurre l'entità dei movimenti se il terreno presenta eccessi d'aria, accumuli e distribuzione irregolare. Le piastre , dopo l'agitazione, devono permanere per il tempo necessario alla solidificazione su una superficie a bolla e non subire scossoni o spostamenti.

Nota : non si ritiene necessario effettuare la deposizione del doppio strato di terreno per ridurre le sciamature di colonie specifiche, considerato il tipo di flora prevalente nel latte. Tale prassi può inoltre in alcuni casi ridurre la leggibilità delle piastre.

7- ESECUZIONE ANALISI BACTOSCAN

Le analisi sono eseguite su strumenti sui quali sono già state eseguite le usuali procedure di controllo previste dai singoli laboratori.

Ogni Laboratorio comunica **una tantum le procedure di controllo adottate** (tipo di controllo e limiti di tolleranza). Si dà quindi per scontato che le prove di confronto vengono eseguite in giornate in cui i controlli dello strumento hanno fornito esito favorevole (non si esclude una richiesta specifica da parte dello scrivente in un secondo tempo di tali dati che , di norma, sono registrati ed archiviati) . Comunicare inoltre, *una tantum*, l'eventuale utilizzo ed il valore di fattori di correzione **del carry-over** dello strumento.

*Nota : nel caso un Laboratorio disponga di **più strumenti** potrà risultare utile ripetere l'analisi strumentale in tempi stretti su più strumenti e riportare i relativi esiti (Report finale , fogli IBC, colonne Strumento).*

Si sottolinea che tali dati non verranno “cumulati” nel senso che per la costruzione della conversione unica ogni campione corrisponderà comunque ad un unico dato strumentale (ottenuto dalla media di più strumenti)..

La disponibilità di repliche su strumenti diversi permette da una parte di incrementare l'accuratezza del dato strumentale fornito dal laboratorio e, soprattutto, di elaborare una retta di conversione specifica del laboratorio sicuramente più rappresentativa ed utile dal punto di vista pratico .

Le analisi al Bactoscan sono eseguite **in doppio in rapida successione** (ogni campione 2 volte, riportando nel report finale ambedue i risultati in Impulsi, non il valore medio).

Nell'ambito di una sessione di lavoro è opportuno analizzare campioni con un livello di contaminazione simile, al fine di eliminare eventuali trascinamenti su campioni a bassissima carica batterica (il trascinamento dello strumento è in genere ridottissimo , controllato ed eventualmente correggibile). Pur non ritenendolo necessario, si ritiene “conveniente” dal punto di vista formale per gli scopi della prova, intervallare **un blank** tra i campioni sottoposti al Bactoscan . Ciò riduce in misura minima i tempi di esecuzione della prova nel suo complesso, e offre comunque la possibilità aggiuntiva di verificare e correggere occasionali trascinamenti (non si richiede la comunicazione dei risultati dei blank).

Punto Critico – come accennato le analisi strumentali devono essere eseguite il prima possibile dopo aver eseguito le diluizioni e più o meno contemporaneamente al versamento del terreno in piastra. Ciò particolarmente importante nel caso dei campioni “analizzati caldi” ed è come, detto il motivo per cui si prevedono sessioni di lavoro con numero limitato di campioni (uniformità tra campioni del medesimo laboratorio e uniformità tra laboratori).

Nota : nel periodo in cui verranno eseguite le prove sono in programma le usuali prove interlaboratorio (A.I.A.) i cui esiti potranno essere richiesti , a posteriori, dallo scrivente ai singoli



Laboratori come “controllo generale” delle prestazioni dei singoli strumenti nel periodo delle prove . E’ possibile che questa verifica venga comunque realizzata direttamente da A.I.A. nell’ambito della disponibilità già comunicata a partecipare alla prova. E’ possibile inoltre che , occasionalmente, si aggiunga a tali controlli l’invio di campioni liofilizzati da parte dello scrivente.

8- INCUBAZIONE DELLE PIASTRE

E’ scontata la condizione di taratura e controllo dell’incubatore (monitoraggio con sistemi automatici in linea, o secondo le prassi applicate dal Laboratorio).

Dopo aver verificato la solidificazione del terreno (in genere sono sufficienti 10-20 minuti) inserire nel termostato (**30 +/- 1 °C per 72 +/- 3 ore**) le piastre capovolte in pile di 6-12 evitando il contatto con le pareti e con le altre pile.

Nota : considerato il tipo e la finalità della prova si ritiene adeguato fissare un limite di variazione della temperatura di incubazione a +/-2 °C; sono, ovviamente, possibili superamenti occasionali di tali limiti in occasione di aperture dell’incubatore.

Nota: sulla scorta delle medesime considerazioni si preferisce evitare la refrigerazione delle piastre pre-incubazione(sia che contengano la sola soluzione di diluente e campione sia che contengano già il terreno solidificato) . In tutti i casi in cui sussistano difficoltà di lettura delle piastre entro l’intervallo di tempo stabilito è invece possibile ricorrere alla refrigerazione delle piastre post-incubazione fino ad un massimo di 48 ore. Allo scopo di ridurre al minimo tali varianti si ritiene preferibile comunque ampliare occasionalmente l’intervallo di incubazione accettabile (fino a 72 +/- 5 ore) riducendo il ricorso alla refrigerazione delle piastre che potrebbe influire sulla qualità delle letture.

9- CONTEGGIO DELLE COLONIE

Riferimento Norma ISO 7218:1996.

Le colonie vanno contate su tutta la superficie della piastra limitando al minimo i casi in cui il numero viene “stimato” sulla base del conteggio di una porzione, che è invece previsto nel caso di colonie sciamanti o di ammassi/catene localizzati (da contare come 1 unità) che impediscono o condizionano la lettura in una porzione di piastra.

La “stima” è da evitare anche nel caso risulti evidente che la distribuzione delle colonie non è uniforme su tutta la piastra (salvo ovviamente le piastre con ridotto numero di colonie); in questi casi è opportuno eliminare le piastre dalla prova e verificare le modalità di semina, miscelazione e le superfici di appoggio delle piastre stesse. .

Evitare infine le “stime” e le “proiezioni” del numero totale in presenza di numeri molto elevati di colonie (eliminare il campione dalla prova e/o ripetere a maggiori diluizioni) .

Allo stesso modo sono da evitare interpretazioni occasionali , vale a dire criteri di conteggio differenziati a seconda del tipo di colonie o della loro diffusione sulla piastra.

Il criterio generale della prova è quindi : “meglio qualche campione in meno che dati ottenuti da condizioni operative variabili”

Riportare nel report dei risultati (Foglio UFC) anche l’**esito “0” (zero)** per le piastre completamente sterili (non compilare il campo per le diluizioni non eseguite / non piastrate) .

Riportare la sigla “**NC**” (non contabili) nel caso di piastre con numero eccessivamente elevato di colonie.

Punto Critico – il numero massimo di colonie contabili è indicato dalle Norma in 300; considerata la variabilità del metodo il limite è in pratica estensibile a **324**.

Allo scopo di disporre comunque di esiti analitici utilizzabili dal punto di vista statistico per la presente prova , si ritiene opportuno riportare negli esiti ANCHE i valori superiori a tale limite



purchè scaturiti da un conteggio accurato e sufficientemente attendibile (indicativamente in condizioni ottimali si possono contare con sufficiente precisione fino a 400 colonie in una piastra) .

Punto Critico – il numero minimo indicato dalla Norma di colonie da sottoporre a conteggio è **10** con criteri specifici per i conteggi inferiori (ISO 7218 del 2007). Per le medesime considerazioni di cui sopra e considerato il livello di contaminazione atteso nella maggior parte dei campioni della prova, si ritiene utile riportare nel report finale **TUTTI i conteggi effettuati** (compresi quindi i conteggi da 1 a 10 colonie). La selezione dei conteggi “idonei” a definire i parametri della retta di regressione sarà eseguita successivamente in fase di elaborazione dati.

Punto Critico - Riportare sempre e comunque tutti i risultati forniti dalle piastre (tra 1 e 324-400) in tutte le diluizioni contabili, anche quando per il calcolo del risultato appaia sufficiente l’ utilizzo delle piastre di una sola diluizione. Eliminare dalla prova (non inviando i risultati) soltanto i campioni in cui risulti evidente un errore di manualità dell’ operatore.

Nota : la disponibilità di dati in eccesso rispetto a quelli utilizzati per il “calcolo del risultato del singolo campione” consentirà di eseguire ulteriori verifiche sul test in sede di elaborazione finale purchè derivino da conteggi accurati.

*Nota : il conteggio tramite **contatori elettronici o** analizzatori di immagini costituisce in linea teorica un elemento vantaggioso (uniformità interpretativa, standardizzazione condizioni di lettura, maggior rapidità di lettura). Per le finalità della presente prova introduce però un elemento di differenziazione tra laboratori (probabilmente paragonabile alla differenza tra operatori nel conteggio manuale.....) che risulterebbe difficile, se non impossibile, definire e quantificare e comporterebbe inoltre un qualche sistema di verifica delle performances fornite dai diversi sistemi (sensibilità, taratura etc.). Di conseguenza, anche considerato il numero ridotto dei campioni da analizzare, si ritiene opportuno scegliere il conteggio manuale come regola per la lettura delle piastre (consapevoli che ciò comporta una teorica maggior variabilità).*

L’ utilizzo di mezzi di supporto visivo (lenti di ingrandimento , microscopio stereoscopico) è invece ovviamente consentito e previsto dalla Norma 4833, in particolare per l’ individuazione di corpuscoli di materiale, oppure come controllo periodico di alcune piastre per verificare la correttezza delle letture.

9.1 CONTROLLO DILUIZIONE E CONTROLLO DI RIPETIBILITA’

La selezione dei dati in funzione della ripetibilità tra piastre della medesima diluizione e del rapporto tra piastre di diluizione diversa, sarà eseguito a posteriori , dallo scrivente, in sede di elaborazione dei dati secondo i criteri previsti dalla relativa Norma quando applicabili o secondo criteri definiti in funzione delle finalità

Nota: la mancanza di un campione in doppio in senso stretto con aliquota/diluizioni/semina/conteggi doppi e distinti rende di fatto solo parzialmente applicabili i criteri di conteggio previsti).

E’ comunque disponibile già nel foglio elettronico del Report risultati, un controllo automatico preventivo che il singolo Laboratorio può consultare (Foglio UFC, Colonna Esito e Fogli “test G”) secondo le indicazioni del punto successivo e che , in ogni caso, non costituisce elemento per selezionare i dati da comunicare come risultato della prova.

10- REGISTRAZIONE DEI RISULTATI

Per la raccolta dei risultati si prega, per ovvi motivi, di utilizzare il foglio elettronico allegato, compilandolo in modo completo ed accurato, anche quando ciò possa apparire a prima vista ripetitivo. Si consiglia inoltre di inviare i primi dati dopo una prima serie di prove completate, in modo da poter evidenziare in tempi brevi eventuali problematiche e risolverle prima di procedere con il lavoro.



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**

“BRUNO UBERTINI”

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

Via Bianchi, 9
25124 BRESCIA
Tel. 030-22901
Fax: 030-2290537

Pag. 9 di 10

Nota : (Per IZZSS) prove eseguite in Laboratori diversi (Sezioni) vengono registrate in Report separati contraddistinti dalla denominazione del Laboratorio in cui si eseguono le prove.

La cella Ente/Lab viene compilata con la sigla IZS/APA/ARA/XXX e un identificativo libero per il Laboratorio (città, sigla, denominazione).

Nel presente documento sono previste alcune comunicazioni di informazioni definite “una tantum” per le quali si richiede un invio separato in formato di testo da eseguire quanto prima e comunque non oltre l’invio degli ultimi esiti analitici.

Come accennato in precedenza nel Report dei risultati al Foglio UFC è attivo un automatismo che segnala (nella colonna “Esito”) l’esistenza di dati non perfettamente (*) o decisamente anormali (**) rispetto ai limiti di ripetibilità preimpostati. Nel foglio “test G” è anche possibile eseguire il controllo di corrispondenza tra diluizioni.

Si sottolinea che tali modalità di controllo NON COSTITUISCONO elementi di giudizio e selezione per i dati da inviare come risultati, ma semplicemente un supporto per il singolo Laboratorio per la verifica del proprio operato e l’eventuale segnalazione di situazioni non perfettamente “normali”.

L’applicazione reale dei criteri di selezione statistica dei dati sarà eseguita a posteriori dallo scrivente in funzione di criteri appositamente costruiti in funzione delle modalità di esecuzione della prova (che come detto, discostandosi per alcuni aspetti dalle Norme , prevedono modalità di controllo adattate)

NOTA BENE : se nel Foglio UFC dovessero esserci problemi di visualizzazione dell’esito calcolato attivare la funzione “arrotonda.multiplo” in Excell una volta aperto il file (Menu Stumenti , Componenti aggiuntivi, selezionare “Stumenti di analisi” e “Strumenti di analisi VBA”) .

Nota : si richiama in particolare la necessità di utilizzare il numero di identificativo dei campioni in associazione alla data di esecuzione delle analisi per permettere la rintracciabilità dei dati sia nell’ambito dei diversi fogli del Report prodotto dal singolo laboratorio, che tra i dati forniti da Laboratori diversi in sede di elaborazione finale.

11- METODI / FASI ALTERNATIVI

Sebbene in linea generale la finalità della prova consigli di evitare “alternative” è possibile concordare con lo scrivente alcune varianti a singole fasi (purchè applicate in modo costante su tutti i campioni analizzati da un singolo laboratorio) derivanti da particolari situazioni operative. Rientra in quest’ambito la richiesta di utilizzare anziché le classiche Piastre di PCA , sistemi differenti (Petrifilm); è evidente che tali prove sono eseguibili in quanto rivestono comunque un interesse tecnico-scientifico, ma verranno elaborate separatamente da quelle finalizzate alla costruzione della conversione unica.

Per motivi leggermente diversi si preferisce non adottare modalità di semina diverse da quella per inclusione in quanto, sebbene previste dalla Norma ISO 7218 non risultano essere le più diffuse nei Laboratori che eseguono determinazioni analitiche per la qualità del latte e costituirebbero elementi di diversificazione nell’insieme dei dati da utilizzare.

12- RIFERIMENTI SPECIFICI

- UNI EN ISO 4833:2004 Metodo orizzontale per la conta di microrganismi. Tecnica della conta delle colonie a 30°C
- ISO 7218: 1996 Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examinations
- ISO 7218: 2001 Microbiology of food and animal feeding stuffs- General rules for microbiological examinations A.1
- ISO 7218 (3° Ed. 2007) : Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations
- ISO 8261: 2001 IDF 122 – Milk and milk products- General Guidance for the preparation of test samples, initial



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**

“BRUNO UBERTINI”

(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

BRESCIA

Via Bianchi, 9
25124 BRESCIA
Tel. 030-22901
Fax: 030-2290537
Pag. 10 di 10

suspensions and decimal dilutions for microbiological examination

- ISO 21187 : 2004 FIL 196 : Milk - Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results

13- RIFERIMENTI GENERICI

- ISO 835 : Laboratory glassware – Graduated Pipettes
 - ISO 8655-1 : Piston –operated volumetric apparatus – Part 1
 - ISO/TS 11133-1 e 2 : Guidelines on preparation and production of culture media
 - ISO 16140 : 2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods
 - ISO 8196 -1 e 2 FIL 128-1 e 2 : Milk - Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis – Part1 : analytical attributes of indirect methods. Part 2 Calibration and quality control in the dairy laboratory
 - ISO 8199 : water quality – general guidance on the enumeration of micro-organism by culture
- =====