

# **RACCOLTA DATI PER L'AGGIORNAMENTO DELLA EQUAZIONE DI CONVERSIONE PER LA DETERMINAZIONE DELLA CARICA BATTERICA NEL LATTE CRUDO DA METODO OPTOFLUORIMETRICO**

## **NOTE APPLICATIVE**

### **introduzione e aspetti generali**

Nel 2010 con il Coordinamento e l'organizzaizone del Centro di Referenza per la Qualità del Latte Bovino del IZS di Brescia, sulla base di oltre 1550 dati ottenuti da 15 laboratori italiani, è stata calcolata una retta di conversione di rilevanza nazionale tra Impulsi ottenuti con strumento Bactoscan FC e Unità Formanti Colonia (UFC/ml) rilevate con il metodo della semina in piastra (UNI EN ISO 4833:2004) su campioni di latte crudo vaccino rappresentativo delle diverse realtà territoriali, .

Il progetto attuale, che ripropone analoghe attività operative, è finalizzato all'aggiornamento di questa retta di conversione e all'ulteriore miglioramento della sua rappresentatività. E' rivolto pertanto a tutti i laboratori sul territorio italiano che utilizzano strumenti basati sulla medesima tecnica analitica per la determinazione della conta batterica totale nel latte, sia che abbiano già partecipato al progetto precedente o no.

Di seguito vengono fornite le indicazioni operative per la realizzazione delle prove -

Per quanto le stesse siano già state inviate in occasione del primo circuito, riteniamo opportuno rimandarle esattamente nella stessa forma (con gli opportuni aggiornamenti normativi) per garantire la massima uniformità esecutiva tra i Laboratori partecipanti (che abbiano o meno partecipato allo studio precedente)

Le indicazioni operative riportate di seguito fanno riferimento, prioritariamente, alla UNI EN ISO 21187: 2006 (FIL/IDF 196:2004): "Determinazione quantitativa della qualità batteriologica (Latte - linee guida per stabilire e verificare una relazione di conversione tra i risultati di un metodo di routine e i risultati di un metodo di ancoraggio).

In linea generale vengono descritte alcune istruzioni pratico-applicative a completamento/chiarimento di quanto previsto da specifiche Norme Internazionali e vengono delineati inoltre, alcuni aspetti particolari, legati a necessità, scelte tecniche o organizzative specifiche del tipo di prova che si intende realizzare.

La descrizione dettagliata e minuziosa delle singole operazioni trova motivazione nella necessità prioritaria di garantire il maggior livello possibile di **uniformità** di comportamento tra laboratori che normalmente differiscono in termini di disponibilità, esperienza e prassi operative interne.

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.*

### **TIPO E QUANTITA' DEI CAMPIONI**

Ogni Laboratorio analizzerà un centinaio di campioni ( non meno di 50, non più di 100) di **latte crudo vaccino di massa** aziendale, distribuiti in modo più o meno uniforme fino a giugno 2012, 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 dell'apparecchio optofluorimetrico 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** con lo strumento optofluorimetrico di utilizzo.

*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).*

**I laboratori che hanno già partecipato al progetto precedente possono partecipare con un numero inferiore di prove e , diversamente dagli altri laboratori, sono invitati a produrre dati privilegiando quelli che rientrano nelle classi di maggior contaminazione batterica ( intervalli di impulsi da <10.000 a 99999)**

<b>TAB.1 – Selezione dei campioni in funzione della contaminazione</b>	
<b>INTERVALLO IMPULSI</b>	<b>% sul totale dei campioni</b>
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 dovrà riportare nel Report finale ( Foglio 1, Colonna “Conservante.”) per ciascun campione la sigla “**C**” (specificando quale conservante nella colonna note ) e nella colonna “Refrig” l a sigla “**NO**” 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 da sottoporre 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 trascinamento 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 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 comprese 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), periodo durante il quale 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.

**Punto Critico** – la **miscelazione del campione**) rappresenta una fase critica per la corretta esecuzione della prova Deve essere eseguita prima del prelievo dell'aliquota destinata alle diluizioni e con movimenti lenti, regolari e ripetuti di rotazione e capovolgimento (UNI EN ISO 6887-5:2010: prevede 25 capovolgimenti ). Prolungare la miscelazione qualora il campione risultasse “molto pieno” o presentasse evidenti segni di affioramento (tipico dei campioni freddi ad elevato tenore in grasso). Deve essere evitata l'agitazione vigorosa in quanto la conseguente 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 apparecchio optofluorimetrico).*

Il prelievo dell'aliquota per le diluizioni deve essere eseguito entro un intervallo di tempo indicativo di 1-2 minuti (la Norma UNI EN ISO 6887-5:2010 indica di non eccedere i 3 minuti) dopo la miscelazione. L'analisi all' apparecchio optofluorimetrico 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 onde 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 UNI EN ISO 7218:2007) . .*

#### **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 .

*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.*

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: Le procedure operative attuate da ciascun laboratorio sono ritenute in grado di garantire e controllare la sterilità del materiale e di tenere sotto controllo il livello di contaminazione ambientale ( aria e superfici di lavoro).*

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**  $\frac{1}{4}$  sterile possono essere approntate anticipatamente, nell’arco della medesima sessione di lavoro.

**Punto critico** - ogni provetta, dopo l’inoculo e prima del prelievo dell’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 l’apparecchio optofluorimetrico 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.

<b>Tabella 2- Terreno PCA Agar x campioni di latte</b>	
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 (secondo il 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 (se troppo bassa non consente una diffusione omogenea dell'aliquota di campione e quindi delle colonie che si formeranno, troppo alta rischia di uccidere/stressare i microrganismi): è quindi opportuno mantenere il terreno in bagnomaria termostato 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 UNI EN ISO 4833:2004 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 CON APPARECCHIO OPTOFLUORIMETRICO**

Le analisi sono eseguite su strumenti utilizzati per 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** anche di differente tipologia potrà risultare utile ripetere l'analisi strumentale in tempi stretti su più strumenti e riportare i relativi esiti ( Report finale , fogli IBC, colonne Strumento ) chiaramente differenziati per tipo di strumento ..*

*Si sottolinea che tali dati non verranno "cumulati": per la costruzione della conversione unica ogni campione corrisponderà comunque ad un unico dato strumentale (ottenuto dalla media di più strumenti del medesimo tipo)..*

*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 all' Apparecchio optofluorimetrico sono eseguite **in doppio in rapida successione** (i due risultati di ciascun campione dovranno essere espressi in Impulsi nel report finale singolarmente e non come 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 testati con l'apparecchio optofluorimetrico. 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 è 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).

## **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 max 6 pezzi evitando il contatto con le pareti e con le altre pile.

*Nota : considerato il tipo e la finalità della prova si ritiene opportuno controllare il limite di variazione della temperatura di incubazione; sono, ovviamente, possibili superamenti occasionali di tale limite dovuti alle 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 7218:2007.

Le colonie vanno contate su tutta la superficie della piastra. La “stima” del numero effettuata sulla base del conteggio di una sola porzione va limitata ai casi in cui la presenza di colonie sciamanti o di ammassi/catene localizzati ( da contare come 1 unità) impedisca o condizioni 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 1) 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 dalla Norma UNI EN ISO 7218:2007 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 fissato a **10** con criteri specifici per i conteggi inferiori (UNI EN ISO 7218:2007 ). 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 teoricamente una maggiore variabilità).*

L'utilizzo di mezzi di supporto visivo (lenti di ingrandimento , microscopio stereoscopico) è invece ovviamente consentito e previsto dalla Norma UNI EN ISO 4833, in particolare per l'individuazione di corpuscoli di materiale, oppure come controllo periodico di alcune piastre atto a 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).*

## **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 tempestivamente eventuali problematiche e risolverle prima di procedere con il lavoro.

*Nota : ( Per IIZZSS) 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).

L'applicazione reale dei criteri di selezione statistica dei dati sarà eseguita a posteriori in fase di elaborazione 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)

### **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); tali prove, eseguibili in quanto rivestono comunque un interesse tecnico-scientifico, verranno elaborate separatamente da quelle finalizzate alla costruzione della conversione unica.

Modalità di semina differenti da quella per inclusione non sono invece consigliate in quanto, sebbene previste dalla Norma UNI EN ISO 7218, non risultano essere le più utilizzate nei Laboratori preposti alla valutazione della qualità del latte e costituirebbero pertanto 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
- UNI EN ISO 7218 ( 3° Ed. 2007) : Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche
- - 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
- UNI EN ISO 6887-5:2010 Microbiologia di alimenti e mangimi per alimenti: Preparazione dei campioni di prova, della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali per l'analisi microbiologica. Parte 5: Regole specifiche per la preparazione di latte e prodotti derivati

### **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

=====