



Istituto Superiore di Sanità

Dip Sanità Pubblica Veterinaria
e Sicurezza Alimentare

**Laboratorio Nazionale di Riferimento
per il latte e i prodotti a base di latte**

IZS Lombardia ed Emilia Romagna

“Bruno Ubertini”

**Centro di Riferenza Nazionale per la
qualità del latte bovino**

**Aggiornamento dell'equazione di conversione per la determinazione
della carica batterica nel latte tramite apparecchiature automatiche
operanti in citometria di flusso**

**“produzione e validazione della conversione nazionale Bactoscan FC -
anno 2012”**

Report rev. 3 - 15 maggio 2013



PREFAZIONE

Il Reg. (CE) N°1664 /2006, che modifica il Reg. EC N°2074/2005, stabilisce che la norma EN/ISO 4833 è il metodo di riferimento relativo al latte crudo e al latte trattato termicamente per la verifica del criterio relativo alla conta delle colonie a 30°C riportato nel Reg (CE) n 853/2004 (All. III, sez IX, parte III). Tale criterio deve essere verificato per ogni produttore almeno due volte al mese e, per un periodo di 2 mesi, il limite stabilito è $\leq 100\ 000$ ufc/ml come media geometrica mobile.

Il Reg. 1664/2006 dichiara inoltre accettabile l'impiego di metodi alternativi per la conta delle colonie a 30° C, qualora questi metodi siano convalidati in base al metodo di riferimento EN/ISO 4833 e conformemente al protocollo stabilito dalla norma EN/ISO 16140 o ad altri protocolli simili riconosciuti a livello internazionale . In particolare , lo stesso Regolamento stabilisce che il rapporto di conversione tra un metodo alternativo ed il metodo di riferimento sia stabilito conformemente alla norma ISO 21187 che , tra l'altro , stabilisce che la definizione della retta di conversione tra il metodo di riferimento ed il metodo alternativo deve portare all'espressione di risultati nella stessa unità di misura (ufc/ml) e che la correttezza della retta di conversione deve essere verificata regolarmente ed aggiornata, se necessario.

La conta delle colonie a 30°C nel latte crudo è una valutazione che viene eseguita nell'ambito dei controlli ufficiali secondo il (EC) Reg N°853/2004, nell'ambito dei programmi di pagamento del latte sulla base della qualità e rappresenta tra l'altro anche lo strumento di base per la programmazione del processo di trattamento termico da applicare sul prodotto crudo, con evidenti ricadute sulla qualità merceologica del prodotto finale .

Di fatto quindi , la corretta valutazione della conta delle colonie a 30° C non è solo il primo passo per il corretto giudizio del prodotto ai fini della sicurezza alimentare, ma è anche la base per la corretta valutazione merceologica dello stesso prodotto sia in ambito nazionale che negli scambi.

Dal momento dell'introduzione dei metodi alternativi ad oggi, cioè a partite dagli anni 80, i metodi alternativi per il controllo routinario del latte hanno trovato una crescente diffusione nei laboratori che effettuano la conta delle colonie a 30° C, grazie all'indiscutibile vantaggio di ottenere risultati in tempi estremamente brevi (circa una decina di minuti /campione rispetto ai 3 giorni del metodo di riferimento) e compatibili con la tipologia del prodotto, una eccezionale semplicità operativa e una discreta standardizzazione della procedura. Grazie a questa rapidità di analisi, oggi, il metodo alternativo a citometria di flusso è applicato nel controllo di almeno il 95% del latte nazionale

La reale possibilità di eseguire la conta delle colonie a 30°C nei tempi e nei modi adeguati alla tipologia del prodotto rappresenta inoltre un autentico punto di forza per sostenere il sistema di pagamento del latte all'allevatore in funzione della qualità del prodotto , sistema istituito fondamentalmente per incentivare e mantenere alta la qualità microbiologica delle produzioni.

Tuttavia, un problema che da sempre accompagna il metodo alternativo basato sulla citometria di flusso è quello della definizione di una modalità di conversione (sotto forma di retta di regressione) che “consenta di trasformare correttamente il dato strumentale nell'unità di misura richiesta dalla normativa per il metodo di riferimento . C'è unanime consenso sul fatto che i fattori che possono avere effetto sulla correlazione tra metodo alternativo e metodo di riferimento siano molteplici (tipo di popolazioni batteriche, fase di crescita, condizioni di conservazione del campione, differenze geografiche, differenze stagionali, metodo di mungitura ...) tali da rendere inevitabile l'elaborazione da parte di ogni laboratorio di una propria retta di conversione oppure, tutt' al più, ancora oggi, di rette elaborate su scala nazionale limitatamente a pochi paesi.

Formulare una retta di conversione unica a livello nazionale significa quindi armonizzare la valutazione dei controlli su scala nazionale, ottimizzando la riproducibilità del metodo di prova e, di conseguenza, l'uniformità delle valutazioni sulla qualità igienica del latte a livello nazionale.

Secondo EN ISO 16140, il protocollo per la validazione dei metodi alternativi consiste di 2 fasi:

- uno studio comparativo del metodo alternativo rispetto al metodo di riferimento

- uno studio interlaboratorio per i due metodi.

In Italia, il Centro di Riferenza per la qualità del latte bovino dell'IZSLER di Brescia ha realizzato nel 2009 il primo progetto di raccolta dati per l'elaborazione di una retta di conversione nazionale.

Lo scopo è stato quello di:

- calcolare una retta di conversione rappresentativa della realtà geografica italiana (maggior peso internazionale)
 - migliorare l'uniformità di valutazione tra i laboratori, attraverso l'utilizzo di una retta comune (eliminazione delle difformità di risultati, a parità di campioni, tra laboratori di aree vicine ma diverse)
 - supportare i laboratori coinvolti nel processo di accreditamento e validazione della conversione
- > attraverso l'elaborazione dei dati di validazione individuali per ogni laboratorio partecipante che abbia prodotto dati utilizzabili per il calcolo della retta (e in numero sufficiente alla validazione individuale)
- > dando la possibilità ai laboratori partecipanti di "adottare" la retta di conversione con necessità della sola verifica, qualora il laboratorio abbia prodotto dati utilizzabili per il calcolo della retta, ma in numero insufficiente per la validazione individuale.

Il lavoro si è concluso con l'elaborazione di una retta di conversione comune facoltativamente utilizzabile dai laboratori partecipanti.

Nel 2010 Il Laboratorio Comunitario di Riferimento (LCR) per il latte e i prodotti a base di latte di Maisons-Alfort, formula l'obiettivo di puntare all'elaborazione di una retta di conversione comunitaria che possa finalmente armonizzare il sistema di conversione a livello europeo scavalcando le diverse realtà nazionali. Pertanto, relativamente al metodo alternativo al metodo EN/ISO 4833, definisce dei criteri di validazione che tengono conto dello Standard IDF 161 (ISO/DIS 16297, 2010) e dell'EN ISO 16140.

La difficoltà della prova è sintetizzata nella stessa introduzione della ISO/DIS 16297, che recita:

Any quantitative measurement in microbiology should consider that the microbiological state in a sample must be regarded as one point within the co-ordinates of a multidimensional system, which is to be projected onto the one-dimensional scale of the method applied i.e. plate count, flow cytometry. Aspects such as flora (types and numbers of micro-organisms and their distribution), growth phase, sub-lethal damage, metabolic activity and history, influence to a greater or lesser extent any parameter that is measured. It is evident that any projection of an n-dimensional situation onto an one-dimensional scale is bound to provide a picture of the real situation that will be rather restricted. In this respect one has to bow to the inevitable, regardless of which method of measurement is preferred.

Secondo ISO 21187 i Laboratori Nazionali di Riferimento sono responsabili della valutazione della retta di conversione nei loro paesi. Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per il latte e i prodotti a base di latte (ISS), di concerto con il Centro di Riferenza per la Qualità del Latte Bovino (IZSLER) ed il Centro di Riferenza Nazionale per la Qualità del Latte e dei prodotti derivati degli Ovini e dei Caprini (IZSLT) vara un progetto su scala nazionale finalizzato ad ottenere una retta rappresentativa dell'intera nazione, iniziando dalla specie **bovina**.

Al fine di valorizzare il lavoro di tutti, il programma di esecuzione viene mantenuto appositamente uguale a quello realizzato nel 2009, per poter far confluire i nuovi dati in quelli precedenti ed raggiungere, attraverso una nuova elaborazione, un numero di risultati che possa finalmente essere pienamente rappresentativo della realtà italiana. In accordo alla ISO 21187, scopo del nuovo programma è stato anche quello di approfondire ed estendere i risultati ottenuti con il progetto precedente, aggiornare e corroborare i dati, rendendo utilizzabile da subito l'aggiornamento della nuova retta a livello nazionale.

In ultimo, ma non ultimo, scopo del lavoro è stato anche quello di poter contribuire, nella fase di elaborazione della retta europea da parte del LCR del latte, dati nazionali realmente rappresentativi della realtà italiana, per far sì che la retta di conversione unica europea sia a sua volta adeguatamente rappresentativa anche dei laboratori italiani.



Il risultato del lavoro ha portato all'elaborazione di una retta di conversione pienamente rappresentativa delle diverse realtà italiane. Un particolare ringraziamento va quindi a tutti i partecipanti e ai loro collaboratori che con la loro adesione volontaria e generosa hanno permesso la realizzazione di questo prezioso lavoro che non sarebbe stato possibile realizzare altrimenti .

Il Coordinatore del Progetto

Dott.ssa Anna Maria Ferrini
LNR per il latte e i prodotti a base di latte
(ISS - Roma)

Il Dirigente Responsabile

Dr. Giuseppe Bolzoni
CRN per la qualità del latte bovino
(IZSLER - Brescia)



SOMMARIO

PROGETTO “ CONVERSIONE NAZIONALE 2012”

<i>Nota introduttiva.....</i>	<i>6</i>
<i>Finalità.....</i>	<i>6</i>
<i>Attività svolta.....</i>	<i>7</i>
<i>Risultati.....</i>	<i>7</i>
<i>Selezione dati validi.....</i>	<i>9</i>
<i>Stima della retta di conversione</i>	<i>17</i>
<i>Proposta di nuova conversione unica nazionale.....</i>	<i>20</i>
<i>Conclusione.....</i>	<i>26</i>

NB: nel testo, le modifiche applicate alla rev.2 sono indicate in neretto

PROGETTO “CONVERSIONE NAZIONALE 2012” NOTA INTRODUTTIVA

A circa vent'anni dall'introduzione degli strumenti optofluorometrici per la determinazione della carica batterica nel latte crudo, quello della “conversione” resta uno dei problemi più ardui da risolvere per i laboratori utilizzatori di tali strumenti. Di fatto in questi decenni le riguardevoli performance di questi strumenti in termini di ripetibilità, affidabilità, rapidità hanno rischiato di essere sminuiti a causa delle diverse modalità di trasformazione dei risultati strumentali nella unità di misura ufficiale (UFC/ mL). Più recentemente, la progressiva scomparsa dei modelli precedenti (Bactoscan 8000) e le indicazioni provenienti dalla letteratura e dalla Normativa di settore, hanno portato ad affrontare il problema con un'ottica nazionale invece che di singolo laboratorio. A fine 2008 lo scrivente Centro di Referenza ha proposto in quest'ottica, un progetto volontario per lo studio di una modalità unica di conversione per il Bactoscan FC (Foss, DK). Al progetto hanno partecipato nel corso del 2009, 22 laboratori italiani dei quali 15 hanno realizzato le prove di confronto tra metodica di Riferimento e Metodica Strumentale.

Il risultato di tale lavoro è stata una modalità di conversione unica, applicabile su tutto il territorio nazionale, la cui adozione veniva consigliata anche a Laboratori che non avevano partecipato alle prove, grazie al fatto che le modalità di elaborazione statistica adottate rendevano la prova sostenibile sia dal punto di vista pratico che da quello relativo all'accreditamento dei laboratori.

Nel periodo successivo infatti un numero crescente di laboratori ha modificato le modalità di conversioni adottate in precedenza (in alcuni casi con step progressivi) giungendo a migliorare significativamente l'uniformità degli esiti forniti sul territorio nazionale e, in generale, la riproducibilità del metodo strumentale.

Tutta l'attività svolta e la relativa documentazione sono disponibili sul sito dell'IZSLER (<http://www.izsler.it/>) nella Sezione del Centro Di Referenza QLB, alla pagina “Attività”.

L'applicazione della Conversione Unica non è stata, soprattutto nei primi anni, priva di difficoltà, dubbi o contrasti i principali dei quali hanno riguardato :

- Effetti pratici della modifica rispetto ai dati storici accumulati nei decenni precedenti dai rispettivi clienti di ciascun laboratorio (sia clienti privati che Autorità Sanitarie);
- Richieste da parte di “nuovi” Laboratori che avviavano l'utilizzo dello strumento senza precedenti esperienze o dati;
- Rapporto con le richieste dell'Ente Accreditante in merito alle modalità e alle documentazioni di validazione del Metodo Strumentale (della quale la Conversione è la parte più significativa);
- Incertezze per l'applicazione della Conversione Unica in aree del campo di misura superiori a quello definito.

Per quanto riguarda i primi due Punti il Centro di Referenza si è adoperato attraverso consulenze, pareri, attività informative e formative a supportare i colleghi che ne facevano richiesta.

Per quanto riguarda invece gli ultimi due punti, l'opportunità di sviluppare ulteriormente il lavoro svolto è venuta dalla collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità che ha svolto la funzione di promotore e coordinatore del secondo progetto, realizzato nel 2012 ed oggetto della presente comunicazione.

La funzione di laboratorio nazionale di Riferimento dell' I.S.S. ha inoltre reso possibile la rappresentazione del lavoro svolto e dei risultati ottenuti, presso A.N.S.E.S. (Laboratorio di Riferimento Comunitario); in conseguenza di ciò il progetto realizzato è divenuto parte sostanziale di una simile iniziativa che sta per essere avviata e che punta ad allargare il campo d'indagine a livello internazionale e al secondo strumento del medesimo tipo disponibile in commercio (Bactocount, Bentley).

FINALITÀ

Il progetto, basato sugli stessi principi tecnici di quello del 2009 (Protocollo Operativo e modalità di elaborazione statistica dei dati) si differenzia dal precedente soprattutto per alcune delle finalità:

- Coinvolgimento di un maggior numero di laboratori con conseguente **maggior rappresentatività** delle caratteristiche del latte di differenti aree geografiche (la composizione media della flora batterica di differenti aree geografico/climatiche è uno dei presupposti, seppur non il più rilevante, che non permettono di centralizzare in un unico laboratorio di riferimento l'attività di validazione della conversione);

- **Estensione del campo di applicazione** della conversione a contaminazioni batteriche superiori al limite di Linearità ottimale degli strumenti optofluorometrici (problematica di limitato impatto pratico ma significativa in alcune realtà territoriali);
- **Aumento della significatività statistica** delle stime realizzate in precedenza, offrendo in questo modo una base più solida ed aggiornata al processo di validazione; al tempo stesso rappresentare una sorta di verifica periodica delle osservazioni precedenti (da intendersi quindi come “tenuta sotto controllo del processo di validazione”);
- Fornire al lavoro nazionale una **maggior rappresentatività** rispetto ad analoghi studi realizzati, o da realizzare in futuro, in altri Paesi della Comunità Europea.
- **Incremento della base dati** disponibile per ulteriori indagini di tipo statistico relative all’incidenza di alcuni fattori sull’accuratezza complessiva della Conversione (anche in relazione ad attività simili che si stanno realizzando sul latte di specie animali diverse dalla bovina).
- Costituire le premesse per la “**ufficializzazione**” della **Conversione Nazionale** come sistema di riferimento, obbligatoriamente previsto per la determinazione della carica batterica totale sul latte crudo con valenza sia economico-commerciale che di controllo sanitario in applicazione ai Regolamenti Comunitari del settore.

Nota Bene: contrariamente a quanto fatto nel progetto del 2008, in questa occasione non si procederà alla elaborazione dei dati del singolo laboratorio per la produzione di una retta di conversione “personalizzata”. Ciò era infatti servito, a suo tempo, a fornire al singolo partecipante la possibilità di scegliere tra il risultato del proprio lavoro considerato a se stante, e quello comune. La retta di conversione del singolo laboratorio serviva inoltre a fornire un supporto tecnico per quei laboratori che utilizzavano già in precedenza conversioni autoprodotte al fine di confronto con la propria situazione storica. La situazione attuale appare diversa sia perché il concetto di conversione comune applicabile in una determinata area geografica è ormai comunemente considerato valido a livello internazionale, sia perché molti dei partecipanti al presente progetto adottano già da alcuni anni la conversione unica 2009.

ATTIVITÀ SVOLTA

- 1- La prova è stata realizzata nel periodo Gennaio – Luglio 2012 attraverso l’esecuzione da parte di Laboratori diversi di analisi su campioni di latte bovino, crudo senza sostanze conservanti, eseguite in genere entro 48 ore dal prelievo, con le due metodiche poste a confronto secondo un protocollo operativo condiviso da tutti i partecipanti.
- 2- I Laboratori partecipanti hanno fornito i risultati ottenuti all’ I.S.S. entro fine Luglio 2012
- 3- Nella fase finale della prova è stato inoltre realizzato un test inter-laboratorio al fine di verificare le condizioni operative degli strumenti utilizzati nel progetto; la prova è stata eseguita su campioni di latte crudo bovino liofilizzato e gli esiti con le relative valutazioni sono stati recapitati ai singoli laboratori partecipanti a fine Luglio 2012
- 4- Il Centro di Referenza ha provveduto all’elaborazione dei dati nel periodo Settembre- Ottobre 2012

RISULTATI

- 1- **Base Dati** - Dei 32 laboratori coinvolti nel Progetto, 29 hanno realizzato le prove in doppio ed inviato i relativi risultati per complessivi 1.897 campioni di latte. Ognuno di essi è stato analizzato in doppio con lo strumento Bactoscan e, contemporaneamente, seminato su due piastre per almeno 2 o 3 differenti diluizioni con la metodica di riferimento (ISO 4833:2003) secondo un protocollo operativo distribuito preventivamente a tutti i partecipanti (unica significativa differenza rispetto alla Norma di riferimento **EN ISO 21187** l’esecuzione di un’ unica serie di diluizioni scalari con semina in doppia piastra).

Complessivamente quindi si sono raccolti oltre 10.000 determinazioni analitiche.

2 - Lista Dei Laboratori Partecipanti

Laboratorio	Città	Accreditamento ISO 4833	Accreditamento Bactoscan FC
A. A. F. V. G.	Codroipo (UD)	x	x
A. I. A. Laboratorio Standard Latte	Maccarese (RM)		x
A. P. A. Potenza	Potenza	x	x
A. R. A. Lombardia	Crema	x	x
A. R. A. Molise	Campobasso	x	x
A. R. A. Sardegna	Oristano	x	x
A. R. A. Veneto	Padova (PD)		x
A. S. S. A. M. Centro Agrochimico Regionale Lab. Produzioni Animali	Jesi (AN)		x
ARTEST S.p.A.	Modena	x	x
ASSEGNATARI ASSOCIATI ARBOREA	Arborea (OR)		
CASTALAB di Bussolati e Miti - Associazione Professionale	Fidenza (PR)	x	x
CENTRALE DEL LATTE DI ROMA S.p.A.	Roma		
CENTRO SERVIZI PER L'AGROALIMENTARE	Parma	x	x
CHELAB s.r.l.	Resana (TV)	x	x
FEDERAZIONE LATTERIE ALTO ADIGE	Bolzano	x	x
GRANAROLO S.p.A.	Bologna		x
I. Z. S. DEL MEZZOGIORNO	Tuoro (CE)	x	x
I. Z. S. DELLA SARDEGNA	Sassari		
I. Z. S. LAZIO E TOSCANA	Grosseto		x
I. Z. S. LAZIO E TOSCANA	Roma	x	x
I. Z. S. LAZIO E TOSCANA	Latina	x	x
I. Z. S. LOMBARDIA E EMILIA ROMAGNA	Gariga Di Podenzano (PC)	x	x
I. Z. S. LOMBARDIA E EMILIA ROMAGNA	Brescia	x	x
I. Z. S. PIEMONTE LIGURIA E VALLE D'AOSTA	Torino	x	x
I. Z. S. SICILIA	Ragusa	x	x
I. Z. S. SICILIA	Palermo	x	x
I. Z. S. UMBRIA E MARCHE	Perugia	x	
LABORATORI VAILATI srl	San Paolo (BS)	x	x
LABORATORIO EPTA NORD s.r.l.	Conselve (PD)	x	x
Made HSE s. r. l.	Gazoldo degli Ippoliti (MN)	x	
PARMALAT S.p.A.	Piana Monte Verna (CE)		
Regione Autonoma Valle d'Aosta - Assessorato Agricoltura e Risorse naturali Produzioni vegetali e servizi fitosanitari- Settore Latte	Saint-Christophe	x	x
SALCHIM s.r.l.	Cavriago (RE)	x	
TRENTINGRANA - Consorzio dei Caseifici Sociali Trentini s. c.a.	Trento		x
VENETO AGRICOLTURA	Thiene (VI)	x	x

I laboratori dovevano eseguire un numero minimo di campioni, differente e diversamente distribuito nel campo di misura della contaminazione batterica, in funzione del fatto che avessero già partecipato o meno alla precedente prova. Pertanto il numero e la distribuzione di campioni analizzati per ciascun laboratorio non possono essere direttamente confrontati; l'apporto dei singoli laboratori è andato da un minimo di **17** campioni ad un massimo di 114. Due dei Laboratori hanno inoltre utilizzato contemporaneamente due strumenti analitici dello stesso tipo, fornendo in questo modo una quadrupla determinazione strumentale utilizzata anche per valutazioni di riproducibilità

SELEZIONE DATI VALIDI

Il primo step dell'elaborazione statistica ha riguardato l'applicazione di differenti criteri di selezione dei dati idonei a essere presi in considerazione per lo sviluppo della retta di conversione finale. Preme sottolineare fin d'ora che alcuni di questi criteri sono conseguenti alle regole operative definite nel protocollo operativo, altri sono derivanti dalle esigenze imposte dal modello statistico adottato in relazione alla significatività dei dati mentre, altri ancora, sono stati definiti in fase di elaborazione sulla base di considerazioni "personali" o di "opportunità" che, seppur giustificate in termini tecnico-statistici, sono consapevolmente decisioni assunte *ad hoc* e, pertanto eventualmente modificabili nel futuro.

In tutte queste occasioni le decisioni prese sono state precauzionalmente verificate con doppie elaborazioni statistiche al fine di valutarne "l'impatto" sul risultato finale e sono state quindi privilegiate quelle a minor o nullo impatto.

A- Dati scartati per inidoneità di base

Sono stati scartati **19 campioni** per mancanza di presupposti base quali mancata corrispondenza tra prove strumentali e semina in piastra, incongruità dell'esito riportato nel foglio di calcolo.

Inoltre sono state evidenziate le seguenti differenze rispetto al complesso delle attività realizzate :

- Il Laboratorio n°22 non ha realizzato su tutti i campioni le previste "doppie" repliche delle determinazioni strumentali e in piastra. Non è pertanto stato possibile sottoporre i dati ad una parte dei controlli previsti. E' stata quindi eseguita appositamente una valutazione dell'effetto dell'inclusione / esclusione dei dati del Laboratorio 22, sul risultato finale della Conversione. Si è evidenziato che gli effetti in termini di accuratezza e proprietà della retta risultavano sostanzialmente nulli, e si è pertanto deciso di ricomprendere questi risultati nella base dati complessiva. Va del resto considerato che per Laboratori accreditati, l'esecuzione del metodo di Riferimento in condizioni routinarie risulta affidabile anche con semine in singola piastra per ciascuna diluizione.
- Il Laboratorio 26 ha riportato, in gran parte, esiti relativi ad una sola diluizione per il metodo di riferimento; ciò ha limitato la possibilità del controllo del rapporto tra diluizioni. Questa situazione si viene però a verificare, occasionalmente, anche per altri Laboratori quando si devono eliminare conteggi in piastra superiori o inferiori ai limiti predefiniti (vedi oltre). Anche in questo caso quindi si è ritenuto di mantenere il Laboratorio nel gruppo di fornitori di dati della retta finale in quanto quest'ultima non risultava modificata dalla esclusione.

B- Linearità Strumentale

In considerazione dei limiti di Linearità dello strumento si è provveduto ad eliminare **1 campione** per valori < 10 Impulsi/ μ L e ulteriori **52 campioni** per valori > 70.000 Impulsi/ μ L.

Quest'ultimo intervento è stato assunto considerando da una parte il fatto che da precedenti esperienze (G. Bolzoni et al. 2001 - Milchwissenschaft-M. S. Int.,) confermate anche da altri Autori, era già stato rilevato che malgrado il

limite massimo dichiarato dal produttore sia di 20.000 Impulsi/ μL , il dato strumentale appare statisticamente correlato con il metodo di riferimento fino a 50.000 Impulsi/ μL . (vedi ad esempio figura 1 e 2).

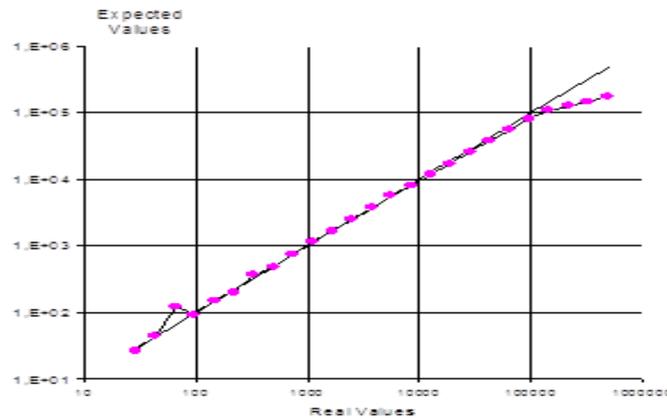


Figura 1. Prova di Linearità Bactoscan FC -Fonte : Bolzoni G., et al. 2001- Milchwissenschaft- M. S. Int., (56), n° 6

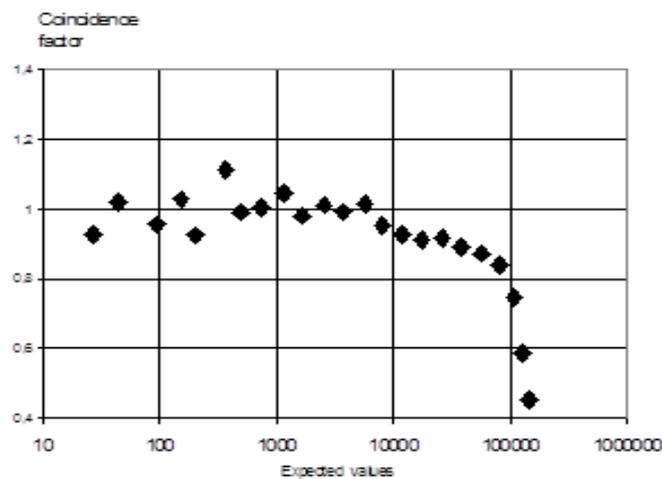


Figura 2. Prova di Linearità Bactoscan FC -Fonte : Bolzoni G., et al. 2001- Milchwissenschaft- M. S. Int., (56), n° 6

Inoltre come detto in introduzione, uno degli scopi del presente progetto era proprio quello di valutare la possibilità di estendere tale limite, consentendo così anche la conversione dati in campioni di latte pesantemente contaminati, estendendo quindi il campo di misura. In sede di elaborazione statistica si è poi valutata l'incidenza dei campioni compresi tra 50.000 e 70.000 per le opportune considerazioni.

In una specifica prova, condotta di recente (attualmente in corso di pubblicazione), abbiamo potuto confermare la significatività della perdita di linearità strumentale nell'area 20.000 - 35.000 Impulsi/ μL , ma abbiamo anche osservato che lo scostamento tra valori attesi ed osservati non sembra incrementarsi al progressivo crescere del valore di contaminazione (vedi Figura 2 B) . In altre parole, una volta superata l'area critica, la perdita di linearità non sembra peggiorare in modo significativo al crescere della contaminazione batterica.

Tenuto conto della variabilità generale della stima che ci si appresta a realizzare e del ridottissimo impatto della precisione in conteggi così elevati rispetto a quelli normalmente osservati nel latte, si è ritenuto quindi opportuno estendere il campo di applicazione della conversione fino a 70.000 Impulsi / μL (evidente il vantaggio pratico rispetto ad una perdita di accuratezza tutto sommato insignificante su valori così enormemente superiori a quelli normalmente osservati nel latte e comunque in genere presenti con frequenza molto limitata)

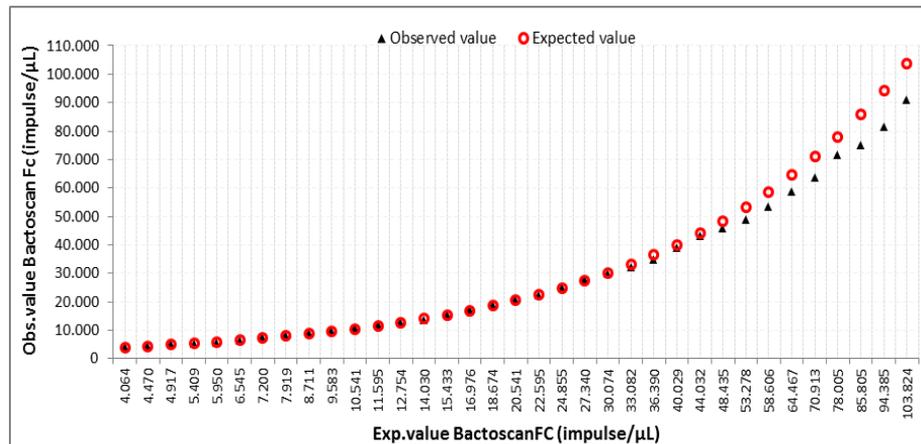


Figura 2 B. Linearità strumentale: andamento degli scarti tra valori attesi ed osservati in funzione del livello di contaminazione

C- Ripetibilità Strumentale

La valutazione è stata eseguita sui valori delle due repliche strumentali evidenziando quando queste risultavano disgiunte rispetto al limite di **ripetibilità strumentale**. Per questo motivo sono stati eliminati **52 campioni di cui 12 presentavano una differenza nei 2 valori che superava anche il limite di riproducibilità previsto per il metodo**. Va ricordato che questi limiti non possono essere definiti in modo fisso in quanto dipendono dal livello di contaminazione e sono quindi definibili come **“Differenze Critiche fra repliche condotte in condizione di ripetibilità o riproducibilità con $P = 95\%$ stimate su valori Logaritmi**), calcolati in base ai rispettivi valori di **Scarto Tipo di ripetibilità o Riproducibilità moltiplicati per il fattore 2,83**.

Vedi ad esempio i campioni n° 20 (ripetibilità) e 76 (riproducibilità) in Figura 3.

Risultato Media	Campione N°	Rep1	Rep2
979	15	1003	955
36,5	16	36	37
1193	17	1153	1233
11687	19	11692	11683
90*	20	105	75
115,5	21	114	109
24	74	24	24
82	75	89	75
301,5**	76	367	236

Figura 3. Valutazione della Ripetibilità Strumentale

D- Valori Massimo e Minimo di Colonie e Rapporto tra diluizioni

Secondo le indicazioni fornite da ISO 7218 : **2007** le piastre con numero di colonie inferiori a **10** e superiore a 300, forniscono conteggi non pienamente attendibili della contaminazione del campione d'origine e **dovrebbero** quindi essere scartate dai conteggi delle varie diluizioni seminate. La medesima norma consente di estendere questi limiti a **4** e **334** colonie, rispettivamente, in casi particolari **considerandoli comunque accettabili**. Considerate le finalità della presente prova, il fatto che tutte le diluizioni sono state seminate in doppia replica e che l'obiettivo di questo tipo di valutazioni è quello di disporre della maggior quantità di osservazione per poterne valutare l'attendibilità, si è deciso di considerare accettabili anche **singoli conteggi con valori da 10 a 5 colonie o fino a 400 colonie** (se ritenute contabili dall'operatore anche su porzioni di piastra). Si sottolinea che l'attendibilità di questi risultati può essere considerata limitata dal punto di vista Normativo quando riferita all'esito di un'analisi e come tale riportata in un rapporto di prova, mentre alla luce del tipo di analisi statistica seguente possono essere ritenuti comunque più che idonei allo scopo.

Su tutti i campioni ritenuti validi si è infatti applicato successivamente il Test G^2 Factor, che consente una valutazione combinata della ripetibilità tra piastre della medesima diluizione ed il rapporto tra le piastre di diluizione diversa (ISO 14461:2005 Annex **A**). Questa procedura che, sostanzialmente, è un'analisi della **devianza** tra repliche e diluizioni consente infatti di "compensare" eventuali conteggi di ridotta precisione eseguiti su una delle piastre prese in esame per valori sopra o sotto i limiti previsti, attraverso la valutazione delle altre piastre valide nelle diverse diluizioni. Questa procedura ha portato in conclusione alla **eliminazione di 179 campioni** per risultati della conta in piastra "non attendibili"

Nota Bene: malgrado l'adozione di un criterio di selezione dei dati meno rigido, il numero di campioni **considerati non affidabili appare significativo** (circa il 10 % del totale), con concentrazioni molto elevate in alcuni Laboratori.

Ciò da una parte rappresenta l'ennesima dimostrazione che il Metodo di Riferimento, necessariamente utilizzato per questo tipo di lavori, presenta anche quando eseguito con un protocollo rigido e preciso, un ampio margine di incertezza rispetto al metodo di routine che "dovrebbe" validare. D'altra parte ciò conferma anche che la determinazione della carica batterica in piastra risulta pesantemente condizionata dall'operatore (diluizione, semina, conteggio) con differenze sistematiche tra singoli laboratori che hanno un'enorme influenza su elaborazioni statistiche come questa (stima della regressione e dei suoi limiti di incertezza). Proprio su questa base si sono definite ed assunte alcune delle decisioni di selezione dei dati di singoli laboratori esposte più avanti.

E- Subdispersione dei dati del metodo di riferimento

Questo parametro di selezione (considerabile "delicato" dal punto di vista procedurale) ha la finalità di evidenziare l'esistenza di risultati per il metodo di riferimento "troppo corretti" oppure "stranamente troppo coincidenti" che, detto in altri termini, potrebbero essere definiti "troppo belli per essere veri". Si tratta di una valutazione statistica basata sul rapporto tra variazione attesa, in determinate condizioni operative, e variazione osservata e rappresenta in fondo una stima di garanzia della veridicità dei dati forniti dai singoli laboratori. Basandoci sul valore di Devianza osservato , rispetto a quello statisticamente atteso tra i conteggi delle colonie delle repliche e delle diluizioni, si è potuto valutare l'incidenza di questi casi anomali. Ovviamente una certa percentuale di conteggi "perfetti" deve essere considerata normale anche dal punto di vista statistico. Attraverso questa stima non si è proceduto ad eliminare nessun campione , ma le osservazioni realizzate sono state poi prese in considerazione per le valutazioni di cui viene riferito al paragrafo successivo.

F- Valutazioni delle performances del Singolo Laboratorio

La valutazione viene eseguita, ovviamente in funzione dell'effetto che i dati del singolo laboratorio hanno sulle caratteristiche della stima finale (retta di conversione comune). E' importante sottolineare che si tratta di una vera e propria "selezione" dei laboratori idonei o meno ad essere mantenuti nella stima complessiva, ma non di un giudizio sulle capacità o competenze del Laboratorio nell'eseguire le analisi. Più semplicemente si tratta di valutare come i dati forniti da ciascun Laboratorio possano modificare quelli di tutti gli altri in termine di regressione tra dati strumentali e dati del metodo di riferimento.

A tale scopo si sono considerati congiuntamente i seguenti elementi :

- **elevata presenza di casi di sub-dispersione (Punto E)**
- **eccessivamente ridotta o eccessivamente elevata dispersione dei dati (Punto F)**
- **elevata presenza di risultati eliminati nella valutazione del G^2 Factor (Punto D)**
- **sistematicità delle differenze (Punto G)**

Per quanto riguarda il secondo punto i valori di dispersione sono elencati in Figura 4 (colonna S corrispondente al valore di $Sy:x$). Si tratta ovviamente della dispersione dei dati per ciascun laboratorio attorno alla propria ipotetica retta di regressione; secondo quanto viene attualmente consigliato, si è considerato **accettabile** un valore inferiore a **0,40** $\log_{10} Sy:x$. I laboratori n° 21, 36, 9, 32, 8, 30, 25, 34 e 33 risultano pertanto fuori da tale limite .

E' stato considerato che questo valore limite è stato definito, in origine, in riferimento al lavoro che un singolo laboratorio mette in atto al fine di produrre una propria retta di regressione sulla quale impostare l'attività di validazione e verifica nel tempo. In tale condizione le esigenze di una base di riferimento il più possibile affidabile e robusta appare giustificato. Nel caso del presente progetto, si è ritenuto che superamenti limitati della dispersione potessero essere comunque accettati in funzione delle seguenti considerazioni:

- il suddetto limite, seppur statisticamente giustificato, è considerato indicativo;
- i superamenti di entità ridotta, in particolare quando il numero di campioni analizzati sia basso, sono di fatto prevedibili in quanto condizionati anche da pochi esiti analitici;
- l'assemblamento dei dati di questi laboratori con quelli di tutti gli altri, riduce notevolmente il peso delle singole dispersioni su quella della retta finale per la quale si valuta lo specifico valore di dispersione;
- attraverso l'eliminazione di pochi campioni (1 o 2 contraddistinti dal massimo scarto) si potrebbe comunque ottenere un rientro nei limiti previsti che si è comunque preferito evitare in quanto questo tipo di selezione viene applicato a posteriore proprio sull'insieme dei dati che compongono la retta finale.

Alla luce di queste considerazioni abbiamo quindi ritenuto lecito, opportuno e sostenibile l'eliminazione dei soli Laboratori n°21, 36, 9 **in quanto non riconducibile entro il limite previsto nemmeno con l'eliminazione di dati outliers.** Si sottolinea che l'eliminazione di altri Laboratori avrebbe da una parte forse migliorato leggermente la precisione della stima finale (Conversione Nazionale), ma ne avrebbe ridotto la rappresentatività delle diverse realtà territoriali.

All'altro estremo troviamo i casi di dispersione troppo limitata . In questo caso non esiste evidentemente un limite ottimale (in teoria il valore tende a zero), ma il valore riguardante il Laboratorio 40 appare anomalo . Il valore osservato si discosta infatti significativamente sia da quello di tutti gli altri laboratori (il più prossimo presenta una dispersione comunque 6-7 volte superiore), sia da quelli che si erano osservati in precedenti esperienze di lavori simili (nel progetto del 2009 ad esempio il Laboratorio con dispersione inferiore aveva un valore di $Sy:x$ di 0,13).

Non siamo in grado di comprendere i motivi di questo esito (potrebbe essere ipotizzabile che i valori di CFU siano stati calcolati sulla base della retta di conversione inserita nello strumento utilizzato dal laboratorio) ma ciò non rientra nello scopo del presente lavoro, considerato **il quale** si è però preferito escludere questa serie di dati da quelli utilizzati per la stima della Conversione .

Nota Bene: si sottolinea ancora una volta che l'eliminazione o meno dei dati di un Laboratorio dall'elaborazione finale non costituisce un "giudizio" sull'operato dello stesso , bensì più semplicemente ed unicamente una valutazione di opportunità basata su evidenze statistiche (in questo caso, in particolare, per un teorico "eccesso di **accuratezza**"). Per quanto riguarda infine il **terzo punto** ci si è posto il seguente quesito: " se un laboratorio presenta un elevato numero di risultati che vengono eliminati per uno o più dei criteri finora citati, è lecito considerare validi a tutti gli effetti i dati rimanenti?" In particolare il "dubbio" riguarda i casi in cui una elevata percentuale di campioni sia risultata non valida per i le valutazioni fatte sui risultati della semina in piastra con il G^2

Factor (ripetibilità e rapporto tra diluizioni); i campioni rimanenti infatti potrebbero rientrare **statisticamente in quelli validi, ma ipoteticamente presentare un rapporto con il valore strumentale (determinante nel costruire la retta di regressione) “anomalo”** rispetto a quello degli altri laboratori.

Si è così evidenziato che il laboratorio n° 36 presentava una quota di campioni eliminati superiore al 50 % di quelli analizzati; trattandosi di dati comunque già eliminati per il criterio della dispersione eccessiva si è semplicemente confermata la decisione assunta.

Il secondo Laboratorio in ordine di numero di campioni eliminati è stato il n° 28; in questo caso la quota era decisamente inferiore ed inoltre i campioni rimanenti si attestavano ad un livello di dispersione piuttosto soddisfacente e si è pertanto deciso di non procedere ad ulteriori eliminazioni .

(Intercept)	log₁₀(IBC)	Sy : x	lab	count
2,118424	1,030969	0,013929	40	50
2,90256	0,779742	0,093097	27	98
2,44324	0,991188	0,14555	14	42
2,2563	1,02797	0,157787	38	36
2,336315	1,040822	0,251726	31	93
2,197675	1,07117	0,2556	35	52
2,171817	1,085945	0,259445	41	16
2,128098	0,996639	0,267685	1	40
2,621987	0,891492	0,276665	39	88
2,55388	1,011904	0,308652	15	26
2,54089	0,971149	0,311806	11	26
2,639418	0,925731	0,322378	23	98
2,482917	0,959331	0,329199	24	50
2,277481	1,092757	0,336567	6	68
3,526002	0,641399	0,354684	28	54
3,662052	0,550801	0,370751	37	79
2,756182	0,859256	0,375691	22	76
2,180667	0,948479	0,376675	26	55
2,474738	1,003358	0,383055	7	22
2,72386	0,929378	0,389306	29	24
3,073394	0,695005	0,41044	33	89
2,178295	1,202943	0,41459	34	103
2,895919	0,76908	0,428628	25	97
2,875925	0,796465	0,43793	30	36
2,62505	0,953103	0,441061	8	34
3,179626	0,69743	0,456749	32	29
3,009938	0,864381	0,622565	9	30
2,532597	0,689751	0,638689	36	32
3,193983	0,888142	0,850489	21	110

Figura 4. Valutazione della dispersione dei dati rispetto alla retta di regressione del singolo laboratorio

La rappresentazione grafica delle considerazioni suddette è presentata in figura 5 come quadro complessivo da cui è apprezzabile ad esempio l'evidente subdispersione del lab. 40 e la sovradisperione dei dati del lab 21 , 36, 9.

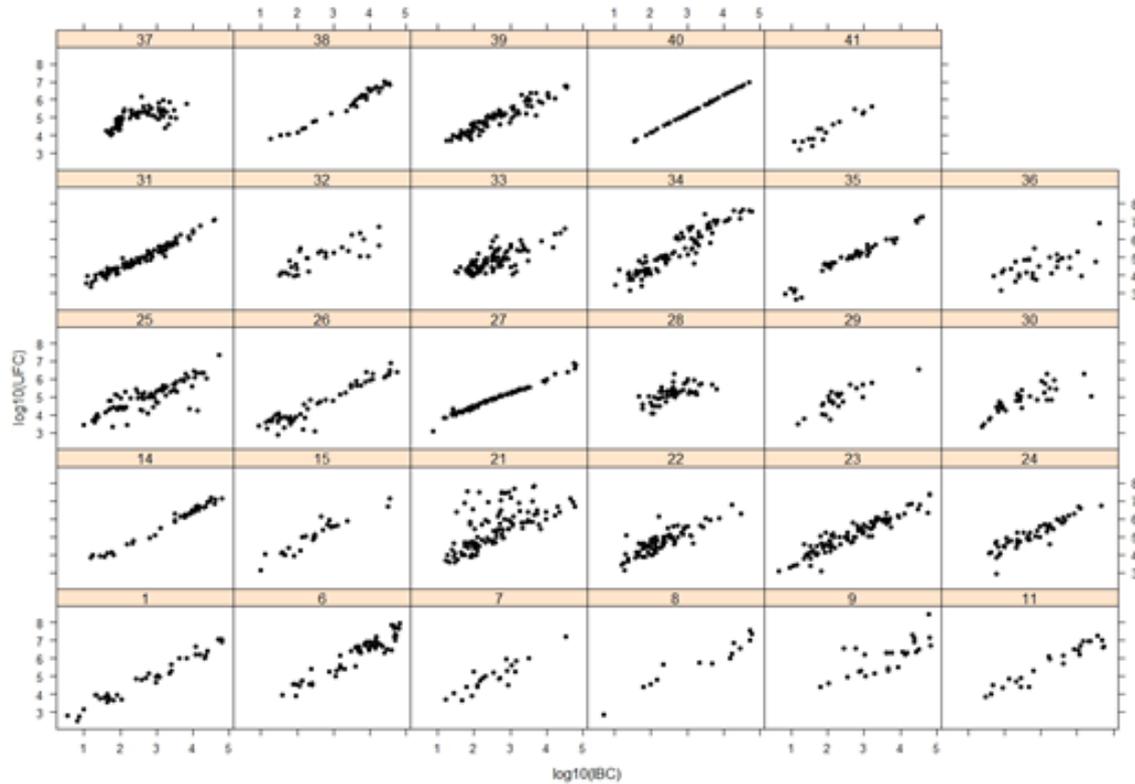


Figura 5. Rappresentazione grafica delle rette di regressione dei singoli laboratori

G- Valutazione delle differenze sistematiche

Strettamente connesso con il tipo di valutazioni precedenti vi è infine l'apprezzamento di eventuali differenze sistematiche tra laboratori, tali da rendere alcuni di essi “statisticamente” diversi dagli altri. La valutazione si basa sull’assunto che, tendenzialmente, la popolazione dei laboratori (e dei relativi risultati) si distribuisca normalmente. In Figura 6 e 7 vengono illustrati gli esiti di questa valutazione.

Tenendo ovviamente conto del fatto che la numerosità dei dati (in questo caso numero di laboratori) e, soprattutto, il tipo di dati analizzati (caratterizzati come detto più volte da ampia variabilità insita nello specifico dell’attività svolta) difficilmente possono produrre condizioni di distribuzione normale strettamente intesa, si può segnalare che:

- i Laboratori che appaiono sistematicamente diversi dal complesso degli altri risultano i numeri 6 e 34 (tendenza sovrastimante) e i numeri 1 e 26 (tendenza sottostimante)

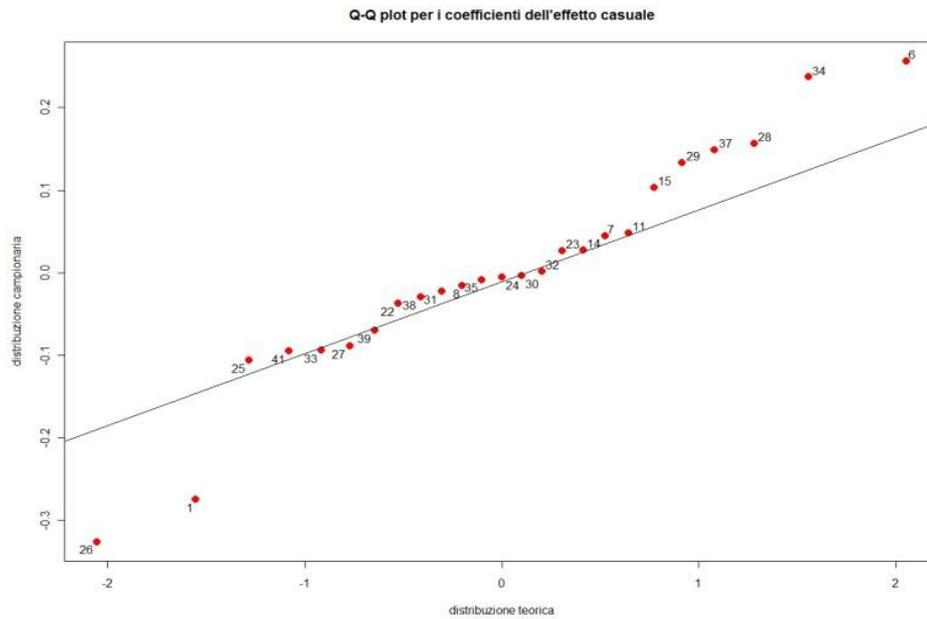


Figura 6. Differenze sistematiche: andamento degli scarti

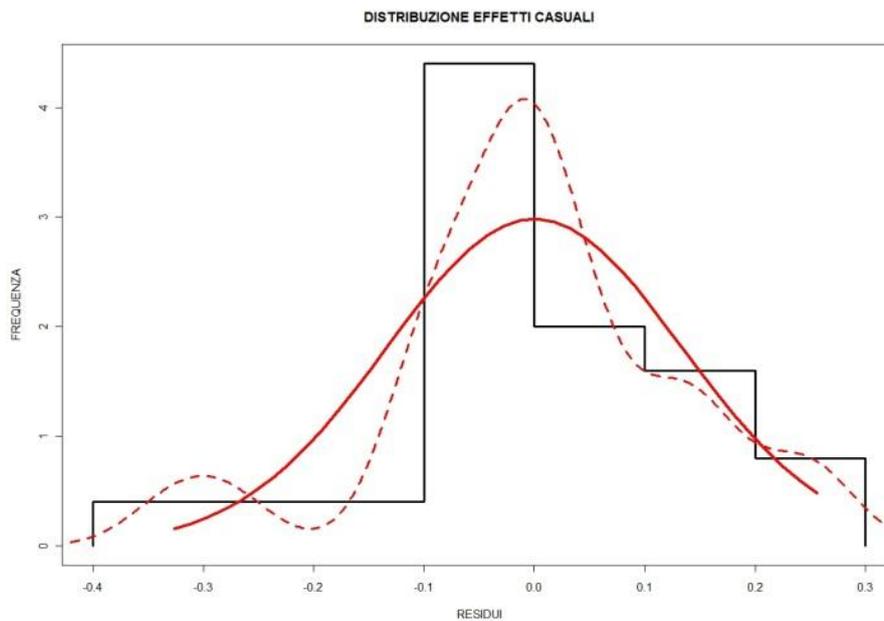


Figura 7. Differenze sistematiche: distribuzione di frequenza rispetto alla “normale” dei Laboratori partecipanti

Pur considerando interessante questo tipo di stima la decisione conseguente è stata quella di mantenere questi Laboratori nel gruppo fornitore di dati per la conversione unica, per due ordini di motivi principali:

1 - Nel precedente progetto realizzato nel 2009, soltanto un Laboratorio risultò sistematicamente diverso dagli altri e si trattava dell'unico Laboratorio che aveva analizzato campioni contenenti sostanze conservanti (ininfluenti sulla determinazione strumentale ma influenti su quella del metodo di riferimento). In questo caso invece risulta impossibile definire se la sistematicità della differenza osservata sia da attribuire al latte analizzato oppure alla modalità di esecuzione del metodo di riferimento. E' infatti evidente che nel primo caso sarebbe assolutamente errato eliminare queste osservazioni (le eventuali differenze nel comportamento della flora batterica del latte di differente origine è infatti proprio il target del lavoro di indagine per la produzione della

retta di conversione). Nel secondo caso invece si tratterebbe di una sorta di “effetto operatore” noto da tempo. Molti sono infatti i fattori che possono portare ad ottenere risultati sistematicamente diversi nelle semine e conteggi in piastra anche quando le procedure analitiche siano rigidamente predefinite (diluizione, miscelazione, capacità di conteggio e distinzione delle colonie, etc.). Questi fattori che sono poi alla base della elevata incertezza di misura della metodica di riferimento sono da considerare “ineliminabili” e, comunque , difficilmente dimostrabili.

2 - La produzione della retta di conversione è lo strumento statistico ritenuto necessario per far fronte alla impossibilità di utilizzare vie alternative per trasformare il conteggio batterico strumentale in equivalenti unità formanti colonia. Il fatto che si debba forzatamente ricorrere ad una stima statistica di questo tipo è la conseguenza diretta proprio del fatto che le due metodiche presentano livelli di incertezza decisamente non paragonabili (la prova inter-laboratorio eseguita nel corso del presente progetto ha del resto dimostrato e ulteriormente confermato che gli strumenti in uso presso i diversi laboratori vengono correttamente utilizzati e forniscono performances di riproducibilità decisamente migliori di quelli ottenibili con la metodica di riferimento).

In conclusione abbiamo ritenuto che la differenza sistematica osservata non fosse tale da determinare la necessaria eliminazione dei laboratori coinvolti dalla popolazione di dati validi trattandosi, tutto sommato, di variabilità attesa o comunque accettabile.

STIMA DELLA RETTA DI CONVERSIONE

Sui 1388 dati validi selezionati secondo i criteri esposti in precedenza (composti ciascuno di doppia determinazione strumentale e media di due piastre per 2 o 3 diluizioni con la metodica di riferimento) si è proceduto alla applicazione del Modello Lineare ad Effetti Misti ormai considerato ottimale per questo tipo di stima. Come già fatto in passato si ritiene utile sottolineare che questo tipo di stima permette, detto in forma semplificata, di rendere il risultato finale “adottabile” anche da Laboratori che non hanno partecipato al lavoro ma che operano in area geografica il cui latte è stato analizzato. Questo aspetto rende quindi “validato” il sistema di conversione a livello nazionale.

Selezione Multistep dei dati outliers

Questo passaggio rappresenta una ulteriore fase di ottimizzazione della stima fornita da modello della regressione lineare e consiste nell’individuare i singoli campioni che risultano più condizionanti sulla accuratezza complessiva della stima (dati outliers). Questa procedura è formalmente prevista per l’ottimizzazione delle stime eseguite da singoli laboratori e quindi tendenzialmente su pochi campioni nei quali la differenza sistematica non può essere valutata (Norma ISO 21187:2006). La sua applicazione nella presente situazione (Modello Lineare ad Effetti Misti tra un numero elevato di laboratori) è quindi una sorta di estensione liberamente scelta e, formalmente, non pienamente prevista, anche se statisticamente sostenibile. Va infatti tenuto conto che nell’assemblamento dei numerosi dati provenienti da differenti laboratori l’individuazione dei valori outliers si focalizza su pochi casi estremamente lontani dall’insieme complessivo (la cui variabilità è evidentemente comunque elevata).

Questo procedimento, applicato in questo tipo di elaborazione statistica, non si limita infatti ad evidenziare i campioni più “lontani” dalla retta comune, ma prende in considerazione contemporaneamente questo aspetto in relazione alla posizione del singolo laboratorio rispetto agli altri. In altri termini, pesa gli scostamenti rispetto all’intercetta (bias), tenendo conto del valore di pendenza (slope) proprio dell’insieme dei dati di ciascun Laboratorio, in termini di Scarto Standardizzato Residuo $> 2,58$.

La selezione di questi campioni è graficamente illustrata in Figura 8.

Nella successiva Figura 9, ci si può invece rendere conto dell’effetto progressivo determinato sulle proprietà della retta risultante dei successivi step di selezione ed eliminazione dei risultati outliers:

- Il primo step individua 33 campioni outliers (colonna N°) e permette di migliorare la stima complessiva della retta in misura abbastanza rilevante ($Sy:x$ da 0,354 a 0,303 e cambiamenti di Intercept e Slope).

- Il secondo passaggio individua ed elimina ulteriori 22 campioni outliers con un miglioramento della stima meno rilevante ma comunque significativo (da 0,303 a 0,284).
Già con il terzo passaggio selettivo il numero di outliers risulta limitato (10) così come l'effetto sulla stima (da 0,284 a 0,278). In seguito si evidenzia che ulteriori passaggi tendono a diventare poco significativi, e quindi sostanzialmente inutili, interessando un numero davvero esiguo di campioni.

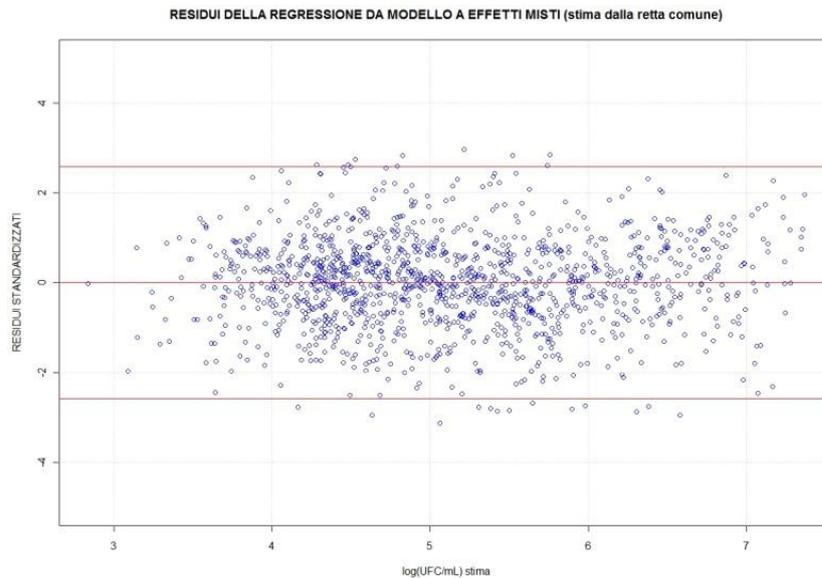


Figura 8. Distribuzione dei residui della retta di regressione

	N°	Syx	Intercept	Slope	Min Std. Residual	Max Std Residual
1	1388	0,354705958	2,613817425	0,925564047	4,21435802	-5,800399803
2	1355	0,30332177	2,601365294	0,934261104	2,96969762	-3,126132535
3	1333	0,2848558	2,57999473	0,943019856	2,755133414	-2,692223201
4	1323	0,278059	2,569411	0,946037	2,671899	-2,618375
5	1316	0,273562449	2,569492368	0,945663311	2,67265	-2,607722768
6	1312	0,271053444	2,569272367	0,945485456	2,575150934	-2,584455657
7	1311	0,270409847	2,571557482	0,945037827	2,582369421	-2,54657828
8	1310	0,269820674	2,573227897	0,944295469	2,578365111	-2,549777972
9	1310	0,269820674	2,573227897	0,944295469	2,578365111	-2,549777972
10	1310	0,269820674	2,573227897	0,944295469	2,578365111	-2,549777972
11	1310	0,269820674	2,573227897	0,944295469	2,578365111	-2,549777972

Figura 9. Selezione Multistep dei dati out-liers

Produzione retta di conversione

Sulla base dati costituita dai 1.323 campioni selezionati è quindi possibile produrre, quale risultato finale di questa fase del progetto 2012, la seguente retta di conversione con relative caratterizzazioni in Figura 10:

$$\log_{10} (\text{UFC/mL}) = \log_{10} (\text{IBC/uL}) \times 0,946 + 2,569$$

Number obs.	1323					
Std	0,278					
	coef	st.err	t	sig	low	hig
inter	2,569	0,038	67,570	0,000	2,493	2,645
log ibc	0,946	0,009	106,910	0,000	0,928	0,964

Figura 10. Proprietà della retta di regressione

La retta viene visualizzata in Figura 11 con il confronto (retta tratteggiata in nero) di quella risultante dal Progetto realizzato nel 2009. Già a livello grafico è possibile apprezzare che le due rette tendono a discostarsi soltanto nell'area di maggior contaminazione batterica e ciò costituiva appunto uno degli obiettivi del presente progetto.

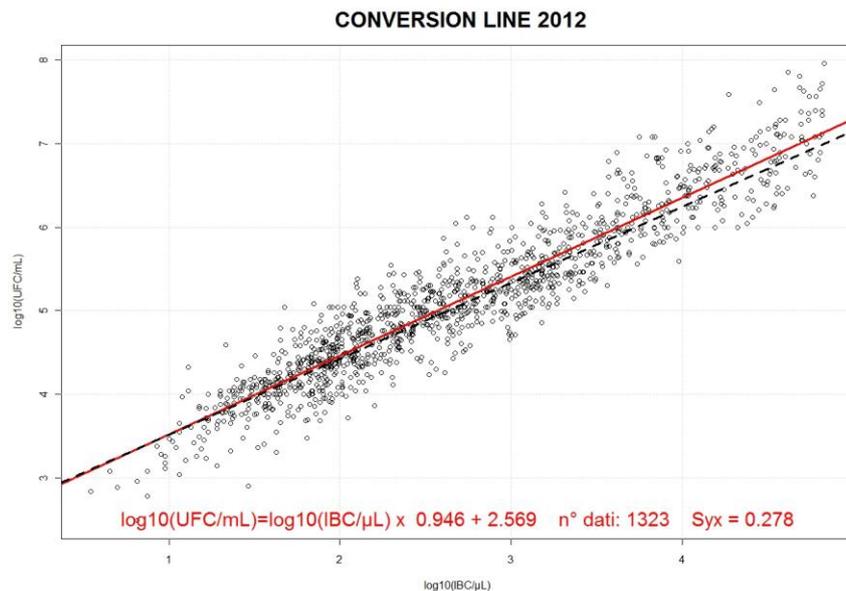


Figura 11. Stima della retta di regressione e confronto con la retta 2009

PROPOSTA DI NUOVA CONVERSIONE UNICA NAZIONALE

Il lavoro svolto nel 2012 è stato concepito e realizzato in modo che fosse sovrapponibile a quello realizzato nel 2009 da un numero più limitato di laboratori. Di fatto tutti gli aspetti tecnici ed operativi così come i criteri di elaborazione statistica sono rimasti sostanzialmente immutati. Come già accennato una delle differenze più rilevanti è stata quella di incrementare la quota di campioni caratterizzati da livelli di carica batterica molto elevata (rispetto alla contaminazione media ed ai limiti normativi) così da indagare la possibilità di estendere il campo di applicazione della Conversione oltre il limite di linearità strumentale dichiarato.

Queste considerazioni permettono, a nostro avviso, di accumulare i due lavori ed i relativi risultati eseguendo un'ulteriore valutazione statistica della base dati disponibile al fine di giungere ad una sintesi finale decisamente più completa, rappresentativa e robusta quindi **idonea a rappresentare a tutti gli effetti la modalità unica nazionale di conversione.**

A tale scopo si sono quindi assemblati i dati validi di ambedue le esperienze, a partire dalla fase precedente la selezione degli outliers. Questi ultimi infatti sono tali nei confronti di una delle rette (2009 o 2012), ma non necessariamente di quella comune che si intende testare. Pertanto la fase **di selezione dei valori outliers** è stata replicata sulla nuova base dati costituita complessivamente da 2862 campioni (data dalla somma dei 1.474 del 2009 e su 1388 del 2012).

Anche in questo caso è possibile evidenziare, in Figura 12, la progressione della selezione degli outliers fino a giungere al 3° step per arrivare a miglioramenti della precisione di stima poco o nulla significativi.

	N°	S yx	Intercept	Slope	Min Std. Residual	Max Std. Residual
1	2862	0,353368587	2,591379896	0,921106713	4,503476572	-5,798394904
2	2793	0,30487385	2,5756425	0,931459144	2,989806782	-3,103354334
3	2752	0,288644521	2,565360809	0,937325499	2,707653001	-2,691818245
4	2732	0,282142	2,559158	0,939463	2,651433	-2,645086
5	2724	0,279650856	2,558340913	0,939350826	2,660479644	-2,597736429
6	2718	0,277849834	2,557326752	0,93934507	2,620963437	-2,590695679
7	2715	0,276941325	2,556494076	0,939751508	2,60897891	-2,552418968
8	2711	0,275730369	2,55404339	0,940241025	2,621321487	-2,562497915
9	2710	0,275422526	2,553960548	0,940184282	2,573612376	-2,56525922
10	2710	0,275422526	2,553960548	0,940184282	2,573612376	-2,56525922
11	2710	0,275422526	2,553960548	0,940184282	2,573612376	-2,56525922

Figura 12. Selezione multistep dei dati outliers (2)

In conclusione del lavoro, con l'assemblamento dei dati del 2009 con quelli del 2012 e rielaborazione complessiva, è possibile identificare la Nuova Retta di Conversione Cumulativa Nazionale delle due fasi del progetto come segue:

$\log_{10} (\text{UFC/mL}) = \log_{10} (\text{IBC} / \mu\text{L}) \times 0,939 + 2,559$
$n^{\circ} \text{ dati } 2.732 \quad S_{y,x} = 0,282$
$\text{campo di applicazione da } 10 \text{ a } 70.000 \text{ Impulsi} / \mu\text{L}$

Le cui proprietà e rappresentazione grafica sono presentate nelle Figure 13 e 14.

Nel Grafico in particolare vengono differenziati in colori diversi i singoli punti derivati dalle due fasi del lavoro che partecipano alla formazione della nuova retta. Si può notare, tra l'altro, la sostanziale coincidenza del complessivo campo di osservazione che conferma la sostenibilità della decisione di assemblare i risultati delle

due prove. E' anche apprezzabile la relativa (e voluta come obiettivo della seconda fase del lavoro) predominanza dei punti neri / 2012 nelle contaminazioni più elevate.

NUOVA CONVERSIONE NAZIONALE (MIX 2009 and 2012)						
N	2732					
Std	0,282					
	coef	st.err	t	sig	low	hig
Inter	2,559	0,032	80,770	0,000	2,496	2,622
log ibc	0,939	0,006	150,380	0,000	0,927	0,952

Figura 13. Proprietà della retta di regressione

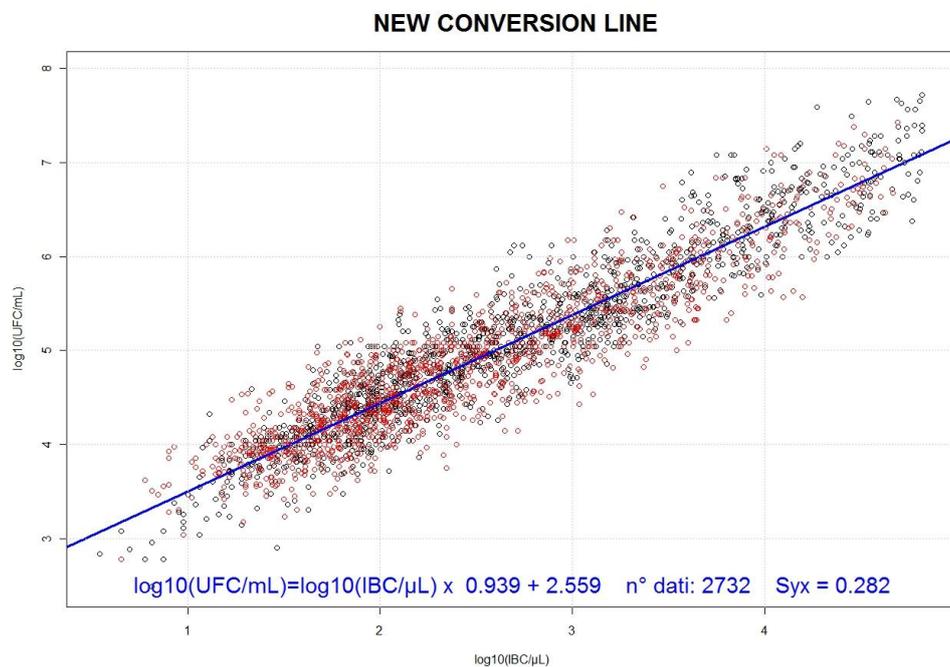


Figura 14. Retta di regressione con dati assemblati 2009 e 2012. Conversione Nazionale

Nota Bene : l'azione di rimescolamento dei dati di due esperienze diverse realizzate in tempi e da Laboratori in parte differenti, può apparire superficiale o improvvisata. Riteniamo invece che questa procedura risponda perfettamente ai requisiti richiesti per le attività di validazione del metodo strumentale rispetto a quello di riferimento in quanto:

- Le procedure analitiche applicate sono state le stesse;
- Le modalità di gestione statistica dei dati sono state le stesse;
- L'area di riferimento geografico (tipologia media di latte) è la medesima;
- Le Norme relative alla validazione della Conversione prevedono esattamente che, periodicamente, la base dati su cui ci si basa venga aggiornata ed arricchita da nuove immissioni che possono eventualmente provocare aggiustamenti progressivi della stima .

EFFETTI PRATICI DELLA NUOVA RETTA DI CONVERSIONE

L'applicazione pratica della grande mole di lavoro svolto si traduce in un intervento decisamente modesto e apparentemente privo di significato: la limitata modifica di alcuni numeri nel software strumentale che esegue la conversione del dato in Impulsi BC/μl in equivalenti UFC/mL (perlomeno se confrontata con la conversione

definita nel 2009). Le ripercussioni di questo piccolo intervento sono però formalmente rilevanti sia dal punto di vista economico (pagamento qualità) che da quello sanitario (commercializzazione ai sensi della Normativa sulla sicurezza alimentare) in particolare per il confronto con i dati storici precedentemente prodotti. A scopo informativo questo effetto può essere direttamente apprezzato dalla Figura 15 in cui per vari livelli di Impulsi, si fornisce l'equivalente valore di UFC con le tre modalità di conversione finora citate.

Nota Bene: a differenza di quanto accaduto nel 2009, in questo caso si parte con una base di maggior uniformità tra i laboratori e, pertanto, gli effetti di “cambiamento” appaiono decisamente limitati.

Il passaggio alla Nuova Conversione Nazionale 2012 comporterà quindi modifiche davvero ridotte difficilmente apprezzabili dal punto di vista pratico per chi usufruisce dei servizi dei singoli Laboratori, ma di enorme rilevanza per quanto riguarda l'uniformità dei risultati prodotti sul territorio nazionale e la riproducibilità del metodo di prova.

	2009	2012	NUOVA CONVERSIONE NAZIONALE
<u>IBC/µl</u>	<u>UFC/µl</u>	<u>UFC/µl</u>	<u>UFC/µl</u>
10	3	3	3
30	9	9	9
50	14	15	14
70	19	21	20
100	26	29	27
150	38	42	40
300	72	82	77
400	93	107	101
700	155	182	171
1000	215	256	239
2000	404	492	457
5000	931	1172	1082
10000	1750	2257	2075
20000	3290	4349	3979
50000	7582	10347	9412
100000	14256	19934	18050

RINGRAZIAMENTI

*Il presente lavoro consente di raggiungere un importante ed ambizioso risultato per il quale hanno lavorato negli ultimi 5 anni decine di operatori tra tecnici di laboratorio e dirigenti delle reti di laboratori degli Istituti Zooprofilattici delle Associazioni Allevatori ed anche di laboratori privati . E' quindi d'obbligo un sentito ringraziamento che non può che essere cumulativo , ma che si riferisce a ciascuna persona che attraverso il proprio contributo ha partecipato ad una "grande impresa" . Mi sento però in dovere di fare almeno un' eccezione rivolgendo un sentito ringraziamento al Tecnico Coordinatore **A. Marcolini** dell'IZSLER di Brescia , senza la cui competenza statistica, sistematica volontà di aggiornare e ampliare le proprie competenze e la titanica pazienza nello spiegarmi per decine di volte i rudimenti della statistica applicata, questo lavoro non sarebbe stato portato al degno compimento.*

NOTA APPLICATIVA

Come già nella precedente esperienza si ritiene opportuno fornire alcune precisazioni per quanto riguarda l'utilizzo della nuova Conversione Nazionale nella sua applicazione pratica a livello di strumento nel singolo Laboratorio.

E' evidente che, dal punto di vista matematico, l'equazione della retta di regressione potrebbe essere esaurientemente rappresentata inserendo due soli punti (due coppie di valori Impulso/UFC) nel software strumentale. Ciò lascerebbe però indefiniti alcuni aspetti particolari, di limitata rilevanza in termini quantitativi, ma determinanti per il corretto ed uniforme utilizzo della Conversione. Questi aspetti riguardano:

- Limite di rilevabilità (min) e gestione valori sottosoglia;
- Limite di linearità strumentale (max);
- Approssimazione dei valori decimali e fasce accessorie.

Limite di Rilevabilità

Formalmente il limite di rilevabilità è dato da 1 Impulso/IBC; sappiamo che il limite inferiore del campo di applicazione della Conversione prodotta con questo lavoro è 10 Impulsi.

Questo limite sembra pertinente anche se si considera che i valori di Blank di controllo (3 valore medio e 5 valore massimo) imporrebbero un "margine di garanzia" per il livello minimo di conteggio dei batteri (considerato un valore di 3 D.S. come indicato da Norma ISO 16140).

La prima coppia di valori da introdurre nel software strumentale sarebbe dunque:

Impulsi/ μ l	UFC/ μ L	UFC / mL *
10	3	3.152 *

- Vedi "approssimazione"

Riteniamo comunque accettabile l'estensione dell'applicazione della retta di conversione fino a valori > 5 Impulsi, considerando che seppur rari questi livelli di contaminazione sono osservabili nei campioni di latte di massa. Inoltre questa estensione permette di gestire meglio il problema di cui si riferirà a proposito delle necessità di approssimazione. Pertanto consideriamo necessario introdurre la fascia seguente lasciando al singolo laboratorio la decisione relativa alla modalità di espressione dei risultati corrispondenti ad un numero di impulsi compreso tra 6 e 10.

Impulsi / μ l	UFC/ μ L	UFC / mL
6	2	1.951 *

Infine si consiglia l'inserimento di almeno una ulteriore fascia al di sotto di tale limite per la gestione dei risultati forniti dallo strumento con numeri di Impulsi < 6; questa fascia non può coincidere con il valore 0 per la funzionalità del software strumentali. Sembra quindi opportuno inserire come prima fascia:

Impulsi / μ l	UFC/ μ L	UFC / mL
1	1	1.000 *

Resta inteso che la gestione di questi esiti analitici può essere liberamente modificata dal singolo laboratorio in funzione di esigenze e procedure proprie di identificazione di campioni "non validi".

Limite di Linearità Strumentale (Valore Massimo)

L'argomento del limite di Linearità strumentale è già stato ampiamente trattato con i risultati del progetto. In sintesi:

- il limite di linearità è indicato dal produttore a 20.000 Impulsi, estensibile comunque fino a 35.000 Impulsi, con perdita relativamente poco significativa;
- In base a precedenti esperienze ed a quanto riportato in letteratura, come sostenuto nel Progetto 2009, è comunque accettabile considerare un limite di 50.000;

- Il presente lavoro ha volontariamente compreso nella costruzione della retta di conversione anche campioni con contaminazione fino a 70.000 Impulsi che pertanto rientrano a pieno titolo nel campo di applicazione.

Questi livelli di contaminazione sono infatti talmente lontani da quelli normalmente osservati nei campioni di latte (o comunque dai limiti normativi) che anche ampi errori di valutazione dovuti alla progressiva perdita di linearità strumentale non assumono nessun rilevante effetto pratico. In sostanza si tratta di campioni con contaminazioni assolutamente fuori dalla norma.

Il singolo Laboratorio può comunque considerare opportuno limitare il campo di applicazione della Nuova Conversione Nazionale ad un livello inferiore sostituendo le fasce finali con un valore fisso (la cui espressione corretta nel Rapporto di Prova sarebbe a questo punto $> X.XXX.000$ UFC/mL) .

In caso contrario l'ultima fascia di calcolo della Tabella strumentale che consigliamo è:

Impulsi / μ l	UFC/ μ L	UFC/ mL
70.000	12.911 *	12.910.610

Va sottolineato che in base a quanto detto in merito alla Linearità strumentale il singolo Laboratorio è autorizzato ad assumere decisioni più conservative e quindi ad inserire quale ultima fascia della Tabella una di quelle elencate di seguito:

Impulsi / μ l	UFC/ μ L	UFC/ mL
20.000	3.979 *	3.979.377
50.000	9.412 *	9.411.632

Approssimazione

E' questo l'aspetto più complesso della applicazione della retta nel software strumentale , seppur il suo effetto pratico sull'espressione degli esiti risulta limitato nella maggior parte dei casi a differenze di pochissime UFC /mL.

Le cifre matematicamente calcolate in base alla retta di conversione per esprimere il risultato finale dell'analisi devono essere inserite nel software strumentale in modo diverso a seconda che il sistema interno del singolo Laboratorio preveda o meno la moltiplicazione per 1.000 dell'esito strumentale in fase di elaborazione finale del dato da inserire nel Rapporto di Prova.

In un caso, in Tabella deve essere inserito il valore di UFC/ mL nell'altro di UFC / μ L. In quest'ultima situazione, evidentemente, il valore viene inserito in Tabella, tal quale come prodotto matematicamente dall'equazione della retta.

Nell'altro caso invece, dovendo dividere il dato matematico per 1.000, è necessario ricorrere a valori approssimati, dato che il software strumentale non consente l'uso di valori decimali.

Nel primo caso quindi sarebbe sufficiente inserire in tabella la prima e l'ultima fascia con i corrispettivi valori limite del campo di applicazione (10 – 70.000 Impulsi) più quelle indicate precedentemente per motivi "tecnici".

Qualunque fascia aggiuntiva non modificherebbe infatti per niente la relazione lineare tra Impulsi e UFC.

Nell'altro caso invece è necessario individuare una fascia aggiuntiva di valore basso, in grado di fare da "riferimento" per minimizzare gli effetti dell'approssimazione. Questa fascia viene scelta al livello di 27 Impulsi in cui l'arrotondamento dei decimali risulta minimo e viene "accompagnata" dalle due fasce indicate di seguito, che servono sostanzialmente alla correzione "fine" dell'approssimazione in queste fasce in cui il "peso" di un 'unica UFC ha un valore percentualmente rilevante.

Impulsi / μ l	UFC/ μ L	UFC/ mL
13	4 *	4.033
27	8 *	8.014
60	17 *	16.969

Queste fasce aggiuntive potrebbero essere del resto **inserite** anche nella parte successiva della Tabella. Va tenuto conto che il miglioramento della precisione (la riduzione dell'errore di approssimazione) si riduce sempre più passando a valori superiori per cui l'effetto pratico dell' inserimento di ulteriori fasce prima dell'ultima risulta quasi più estetico che sostanziale. In ogni caso a scopo informativo si **allega** alla fine del presente documento , una tabella indicante per i vari livelli di Impulsi il corrispondente valore da inserire in Tabella con a fianco la percentuale di errore conseguente all'approssimazione.

CONCLUSIONE

Tenuto conto dei singoli punti indicati sopra, la Tabella che viene indicata come riferimento per l'inserimento nel Software del Bactoscan FC per tutti i Laboratori che hanno partecipato al Progetto, ma anche ad altri Laboratori che operano sul territorio nazionale, risulta essere la seguente

(in rosso le indicazioni facoltative , in nero quelle essenziali):

NUOVA CONVERSIONE NAZIONALE		
IBC/ μ l	UFC/ μ L	UFC/ mL
1	1	1.000
6	2	1.951
10	3	3.152
13	4	4.033
27	8	8.014
60	17	16.969
396	100	99.907
4.597	1.000	999.807
20.000	3.979	3.979.377
50.000	9.412	9.411.632
70.000	12.911	12.910.610

ALLEGATO –

Nota Bene: l’inserimento di una qualunque delle coppie di valori riportati nella tabella seguente, corrisponde alla corretta applicazione della retta di conversione nazionale, ma non aggiunge nulla di sostanziale rispetto ad una Tabella ridotta alle fasce indicate nel precedente documento (Note Applicative).

6	1951	2000	2,5%
7	2255	2000	-11,3%
8	2556	3000	17,4%
9	2855	3000	5,1%
10	3152	3000	-4,8%
11	3448	3000	-13,0%
12	3741	4000	6,9%
13	4033	4000	-0,8%
14	4324	4000	-7,5%
16	4902	5000	2,0%
17	5189	5000	-3,7%
18	5476	5000	-8,7%
19	5761	6000	4,1%
20	6045	6000	-0,8%
21	6329	6000	-5,2%
22	6612	7000	5,9%
23	6894	7000	1,5%
24	7175	7000	-2,4%
25	7455	7000	-6,1%
26	7735	8000	3,4%
27	8014	8000	-0,2%
28	8293	8000	-3,5%
29	8571	9000	5,0%
30	8848	9000	1,7%
31	9125	9000	-1,4%
32	9401	9000	-4,3%
33	9677	10000	3,3%
34	9952	10000	0,5%
35	10227	10000	-2,2%
36	10501	11000	4,7%
37	10775	11000	2,1%
38	11049	11000	-0,4%
39	11321	11000	-2,8%
40	11594	12000	3,5%
41	11866	12000	1,1%
42	12138	12000	-1,1%
43	12409	12000	-3,3%
44	12680	13000	2,5%
45	12951	13000	0,4%
46	13221	13000	-1,7%
47	13491	13000	-3,6%
48	13760	14000	1,7%
49	14029	14000	-0,2%
50	14298	14000	-2,1%
60	16969	17000	0,2%
70	19614	20000	2,0%
80	22235	22000	-1,1%

90	24837	25000	0,7%
100	27421	27000	-1,5%
130	35086	35000	-0,2%
160	42643	43000	0,8%
190	50114	50000	-0,2%
220	57514	58000	0,8%
250	64853	65000	0,2%
280	72139	72000	-0,2%
310	79378	79000	-0,5%
350	88964	89000	0,0%
396	99907	100000	0,1%
500	124377	124000	-0,3%
600	147614	148000	0,3%
700	170617	171000	0,2%
800	193421	193000	-0,2%
900	216052	216000	0,0%
1000	238532	239000	0,2%
2000	457459	457000	-0,1%
3000	669551	670000	0,1%
4000	877322	877000	0,0%
4597	999807	1000000	0,0%
6000	1284074	1284000	0,0%
7000	1484171	1484000	0,0%
8000	1682540	1683000	0,0%
9000	1879409	1879000	0,0%
10000	2074955	2075000	0,0%
20000	3979377	3979000	0,0%
30000	5824334	5824000	0,0%
50000	9411632	9412000	0,0%
53334	10000045	10000000	0,0%
70000	12910610	12911000	0,0%