



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**
“BRUNO UBERTINI”
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)
Centro Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino

Via Bianchi, 9
25124 BRESCIA
Tel. 030-2290541
Fax: 030-2290537

**Centro Referenza Nazionale
Qualità Latte Bovino**

Tel. +390302290541

Fax +390302290537

E-mail: gbolzoni@bs.izs.it ; rqlatte@bs.izs.it

Brescia, 30/09/2007

N.PROT..... GB/gb

Dirigenti Responsabili

Lab. Latte IZZSS

Loro Sedi

INVIATO PER E-MAIL

Oggetto : conversione dati Bactoscan

In Allegato si invia una relazione sul tema di cui all'oggetto finalizzata a fare il punto sull'attuale situazione di difformità tra i Laboratori della rete IZZSS per la quale, su sollecitazione degli stessi, lo scrivente Centro di Referenza intende avviare un tentativo di soluzione.

E' infatti auspicabile l'avvio di un lavoro congiunto di analisi e soluzione del problema che potrebbe in una seconda fase coinvolgere anche laboratori privati o pubblici di altri Enti cointeressati alla questione .

Voglio sottolineare fin d'ora che la relazione seguente non costituisce di per se la soluzione al problema; non mi sembra infatti possibile assumere una decisione risolutiva considerato che gli elementi condizionanti non sono solo quelli di natura tecnica .

Ciò nonostante credo che l'obbiettivo sia raggiungibile attraverso la condivisione di alcune decisioni e l'avvio di una fase di collaborazione.

IL DIRIGENTE RESPONSABILE

Dr. G. Bolzoni



BREVE NOTA STORICA INTRODUTTIVA

Il problema della conversione dei dati degli strumenti optofluorometrici è di vecchia data e non riguarda solo il nostro Paese. Già negli anni '80 con la comparsa della prima generazione di “Bactoscan”, si pose il doppio problema della “taratura” degli strumenti e della “conversione” degli esiti da Impulsi ad UFC. Quest'ultimo problema è stato affrontato in Europa in modi diversi, ma tendenzialmente si è cercato di garantire un comportamento uniforme perlomeno all'interno di un singolo Paese. In Italia ciò non è avvenuto.

Tra i numerosi motivi che hanno impedito il reperimento di una soluzione comune vi è stata anche un'interpretazione, forse troppo rigida del concetto, scientificamente corretto, secondo il quale ogni laboratorio avrebbe dovuto sviluppare una propria modalità di conversione adatta alle caratteristiche del latte della propria area territoriale. Tale concetto, sostenuto anche dal produttore dello strumento, ha costituito il presupposto per cui si è ritenuto necessario differenziare le conversioni anche per il latte di specie diverse.

Nel tempo si sono succedute diverse versioni dello strumento sono comparsi sul mercato strumenti di altri produttori caratterizzati da tecniche analitiche similari, si sono affrontati problemi relativi ai materiali di riferimento ed alle prove interlaboratorio, ma per quello della conversione, che senza ombra di dubbio è fonte di difformità degli esiti tra laboratori diversi, non si è trovata una soddisfacente soluzione comune.

LA SITUAZIONE ATTUALE

Col passare degli anni le difficoltà si sono persino accresciute, in quanto a fianco degli strumenti a disco rotante sono stati introdotti quelli a cella di flusso caratterizzati da differenze rilevanti in termini di linearità, modalità di taratura e precisione (in particolare per i conteggi su cariche batteriche limitate che sono diventate progressivamente quelle più frequenti nel latte analizzato).

Anche se l'utilizzo di strumenti di diversa generazione sia un problema ormai in fase di naturale estinzione, è possibile sintetizzare brutalmente la situazione attuale affermando che: “dopo oltre vent'anni di adozione di strumenti d'avanguardia che consentono di determinare la carica batterica del latte in tempo reale..... il risultato fornito da un laboratorio è, spesso, diverso da quello fornito da un altro a causa delle modalità di conversione”.

Le conseguenze pratiche, economiche, sanitarie ed in qualche caso anche legali sono a tutti note.

Proprio recentemente il problema è stato ulteriormente messo in luce dalle Norme ISO 8126-1, 8126-2 ed in particolare la UNI EN ISO 21187 relative all'adozione di metodi analitici indiretti per i quali è espressamente richiesto che siano accreditati e validati con metodiche di riferimento.

Ogni laboratorio ha assunto nel tempo iniziative in merito: in alcuni casi si sono adottate modalità di conversione fornite dal produttore degli strumenti, in altri si sono sviluppate modalità proprie sulla base di attività sperimentali condotte in prima persona, in altri casi si sono acquisite modalità prodotte da altri Laboratori; molto spesso infine si sono adottate condizioni di lavoro “personalizzate” adottando una delle precedenti soluzioni ed apportando modifiche proprie dovute considerazioni non esclusivamente di tipo tecnico.

Credo essenziale sottolineare che ciò non deriva banalmente da errori o comportamenti “dolosivi” di singoli laboratori, anzi si tratta proprio della conseguenza diretta del tipo di problema di cui stiamo parlando: quale unico esempio basti ricordare che il Metodo di Riferimento anche quando applicato in condizioni ottimali presenta una variabilità decisamente superiore a quella del metodo che dovremmo validare (sia dal punto di vista quantitativo come ripetibilità della semina in piastre sia dal punto di vista dei fattori che influenzano la crescita delle colonie, la loro evidenziazione, la disaggregazione degli ammassi batterici etc.etc.)

LA DOMANDA

E' opportuno ricercare una modalità di conversione comune ?

La domanda è solo in apparenza retorica. Infatti attenendoci strettamente agli aspetti tecnici, ed alle Norme citate in precedenza, dovremmo rispondere che non solo non è opportuno, ma addirittura che non si deve cercare una conversione comune. Se è vero infatti che la flora lattica del latte cambia (tra nazioni, tra regioni, ma anche tra allevamenti) perché dovremmo accettare una conversione nazionale anziché quelle teoricamente più “corrette” ottenute su valutazioni eseguite sul latte locale ?

Potrebbe servire ricordare che chi ha affrontato il problema prima di noi ha concluso che, alla fine, conviene accettare una conversione comune ? Potrebbe servire ricordare che uniformare le performances fornite da una metodica analitica costituisce un comodo vantaggio non solo per i laboratori ma anche e soprattutto per chi “utilizza” gli esiti di questa metodica tanto dal punto di vista commerciale che di controllo ufficiale ?



La motivazione più importante però è, secondo me, un'altra ancora (tenendo conto che l'unica vera soluzione del problema sarebbe l'adozione dell'Impulso come unità di misura ma, salvo “miracoli” indipendenti dalla nostre possibilità, non è realizzabile):

il sistema della conversione porta con sé un margine di errore talmente ampio (ed ineliminabile, come dimostrato anche dai più recenti e cospicui lavori pubblicati) che la teorica maggior accuratezza che dovrebbe essere garantita da una conversione sperimentalmente realizzata su “latte locale” si perde praticamente tutta, a causa del livello estremamente elevato di variabilità della stima ottenuta tramite la regressione dei dati accoppiati tra Bactoscan e Metodo di riferimento. Si tratta soltanto di un'opinione personale, ma le evidenze sperimentali sono decisamente abbondanti. Non è un caso, del resto, che in una recente pubblicazione (S Walte H.G. et al.) studiando alcuni di possibile interferenza sulla conversione (quali ad esempio conservante, razza bovina, tempo dalla mungitura, temperatura di conservazione ed altri) si giunga a concludere che sebbene la loro influenza risulti statisticamente significativa il miglioramento di correlazione che si potrebbe ottenere utilizzandoli per ottimizzare la conversione (ammesso che ciò sia praticamente realizzabile) è quantitativamente trascurabile rispetto alla misura complessiva di variabilità delle stime ottenibile tra le due metodiche.

La “querelle” sul latte locale ha purtroppo un po' le stesse caratteristiche: ci si dovrebbe sobbarcare una notevole mole di lavoro per mettere in evidenza una componente di correlazione che ipoteticamente potrebbe essere leggermente migliorativa della conversione, dovendo però, comunque accettare un livello di errore residuo medio della correlazione tra le due metodiche decisamente molto più alto e che è da considerare non eliminabile.

Purtroppo non abbiamo la possibilità di dimostrare in modo definitivo se l'elevata variabilità che caratterizza TUTTE le stime di regressione calcolate in questi anni, dipenda dalla variabilità del Metodo di Riferimento (e delle prove di confronto nel loro complesso) oppure da differenti composizioni e comportamenti delle flore batteriche che caratterizzano i campioni analizzati.

Chi sostiene la necessità di conversioni locali, chiude però la discussione dicendo “è vero il metodo di riferimento è assurdamente variabile, rispetto al metodo che dovremmo “validare”, ma non essendoci alternativa questa è la situazione su cui dobbiamo operare, quindi perlomeno cerchiamo di affrontare il problema per quella piccola porzione che possiamo studiare, analizziamo cioè campioni con flora locale media. Da questa posizione deriva del resto anche l'impostazione delle attuali Norme sui metodi indiretti; a peggiorare la situazione vi è infine il fatto che tali Norme sono, di fatto, traslate da quelle emanate a suo tempo per i metodi I.R. (grasso, proteine e lattosio) senza tenere nella giusta considerazione che i metodi di riferimento relativi sono ben diversi in termini di precisione e, soprattutto, che per le analisi I.R. non esistono problemi di conversione del dato e pertanto è assente la principale fonte di variabilità.

Dall'altra parte invece, un punto di vista più pratico del problema porta a concludere che una conversione comune (pur conservando un ampio margine di errore residuo nella stima della conversione) consentirebbe perlomeno di eliminare le conseguenze negative di esiti sistematicamente diversi tra laboratori diversi e soprattutto ciascun laboratorio non si troverebbe solo nel sostenere la validità del proprio operato nei confronti dei propri clienti (con la consapevolezza di aver comunque accettato un margine di errore ampio ed ineliminabile). A

In teoria dunque le conversioni locali dovrebbero consentire di ridurre le differenze tra laboratori in quanto utili a rappresentare le caratteristiche del latte normalmente analizzato, in pratica invece (soprattutto a causa della variabilità del metodo di riferimento ma non solo, vedi oltre) il risultato più probabile è quello di un ulteriore ampliamento delle differenze.

La risposta alla domanda iniziale quindi, almeno da parte mia, è che una conversione comunque è opportuna e conveniente.

OBBIETTIVO

Considerato che gli strumenti a disco rotante sono ormai in fase di dismissione, ritengo che questo possa essere il momento più opportuno per proporre un tentativo di uniformazione delle modalità di conversione.

Come primo passo, il Centro di Referenza ha richiesto ai singoli Istituti, la comunicazione delle modalità di conversione e della tipologia di strumento attualmente in uso. A tali informazioni, non sempre ottenute in modo completo, sono state aggiunte quelle di alcuni Laboratori esterni alla rete IIZZSS che, per rilevanza delle attività svolte, costituiscono comunque riferimenti importanti per alcune aree territoriali e con i quali erano già in corso rapporti di collaborazione e confronto sul problema. A seguito delle informazioni raccolte abbiamo potuto sviluppare l'analisi della situazione attuale ed alcune ipotesi di lavoro per realizzare una conversione comune, ottenuta la quale sarà poi possibile ufficializzarne l'adozione presso gli organi competenti (Ministero, I.S.S., Enti di Accreditamento) e coloro che sono professionalmente interessati al tema (Associazioni produttori e trasformatori, Servizi Veterinari ASL); da non escludere ovviamente che anche laboratori di altra collocazione collaborino con l'iniziativa degli IIZZSS.



ALCUNE (NECESSARIE) CONSIDERAZIONI PRELIMINARI

- 1- La conversione dei dati è, notoriamente, collegata al rapporto tra numero di microrganismi contati dallo strumento e numero di microrganismi che concorrono a formare una colonia nel metodo di riferimento; numero quest'ultimo che dipende dalla **specie microbica**, ma anche dalle **condizioni chimico-fisiche** del campione (ad esempio lo "sbattimento" durante il trasporto o la miscelazione dei campioni per la piastratura) ed ancora da altri fattori quali le modalità ed il tempo di conservazione del campione che influiscono sia sulla possibilità di aggregazione dei batteri che sul loro indice di moltiplicazione
- 2- La necessità che la conversione venga calcolata a partire da campioni di latte "rappresentativi" **dell'area geografica** in cui il laboratorio opera, è teoricamente giustificata proprio da questi fatti (per assurdo una flora composta da un'unica specie di diplococchi darebbe un rapporto 1:2 fisso e costante lungo tutto il range di conteggio). – Si ipotizza in questo modo di riuscire ad avere una rappresentazione complessiva e media delle flora batterica e delle condizioni fisico-chimiche e di conservazione dei campioni che il singolo laboratorio analizza normalmente. Quanto in realtà possa differire la flora batterica media di una determinata area geografica rispetto ad un'altra è però un dato che non ha ancora avuto una evidenza scientifica.
- 3- Quanto deve essere estesa un'area geografica per presupporre una differenza significativa tra le specie batteriche contaminanti il latte ? Quanto è diversa la flora batterica del latte di capra rispetto al bovino ? Quanto varia la flora batterica di allevamenti diversi posti nella stessa area geografica, magari con tipi di lettiera diversa ? E' maggiore la differenza tra la flora contaminante scandinava e quella italiana , oppure quella che si può osservare nel latte conservato a 4°C rispetto a quello a 10 °C per i formaggi a latte crudo? Sono alcune delle domande fondamentali alle quali dovremmo poter rispondere, ma sono tipicamente domande alle quali oggi non è possibile rispondere. Di fatto la differente composizione della flora non dipende dalla geografia ma dall'insieme dei numerosissimi fattori che possono caratterizzare un campione . Si presuppone che tali fattori siano , **mediamente**, uniformi in una data area geografica e quindi con una conversione locale si ipotizza di riuscire a rappresentarli in modo accettabile.
- 4- Il ricorso **all'analisi statistica** per la conversione, trova fondamento proprio nelle incertezze e nella mancanza di elementi pratici certi su cui lavorare. Così come il rapporto tra Impulsi e UFC cambia in due ripetizioni di analisi sullo stesso campione (ripetibilità) , tra due strumenti diversi o operatori di semina in piastra diversi (riproducibilità) , così esso cambia tra allevamenti diversi e quindi , logicamente, tra zone geografiche diverse. Ogni addetto ai lavori conosce ed è consapevole che tramite la statistica si può "compensare" l'errore di ripetibilità e quello di riproducibilità (errori intesi come fonte di variabilità ineliminabile) e quindi allo stesso modo non dobbiamo dimenticare che con la conversione dei dati (qualunque essa sia) possiamo semplicemente "compensare" la ineliminabile fonte di errore determinata dal fatto che in ciascun campione di latte possono essere presenti microrganismi diversi che partecipano a formare le colonie in modo diverso anche nella medesima area geografica..
E' proprio la consapevolezza della incertezza insita nella stima di una conversione media per campioni tra di loro diversi (alla quale dobbiamo ancora una volta aggiungere quella relativa alla variabilità, ben più ampia, del metodo di riferimento) che porta a comprendere che quello delle differenze "locali" nella contaminazione del latte è un elemento di diversità relativamente **poco significativo**. Al confronto il vantaggio di una modalità di conversione unica per i laboratori italiani dovrebbe apparire decisamente superiore pur se, anch'essa, con la sua elevata dose di incertezza delle stime. Sono convinto che le medesime considerazioni potrebbero essere ripetute per il latte di **specie diverse**, seppur con alcuni distinguo, ma per il momento è opportuno escludere questo aspetto del problema.
- 5- Un ultimo elemento problematico è quello dei **materiali di riferimento**. Le prove interlaboratorio, i campioni a titolo noto possono servire, e sono serviti, a migliorare le condizioni di taratura degli strumenti, ma poco riescono a fare per il problema della conversione. Il motivo, del resto già noto, risiede nella composizione dei campioni di riferimento. IN breve, quelli a "coltura pura" in matrice naturale o sintetica, si prestano bene a controllare lo stato di taratura e di funzionamento , ma sono (per definizione) inadatti a valutare la conversione. D'altra parte anche quelli a "flora mista" in matrice latte, indipendentemente dalle modalità di preparazione , non possono sostituire il campione "naturale" per le stime di conversione ; ciò dipende in parte dal fatto che la loro composizione influenzerebbe fortemente il risultato in termini di conversione e soprattutto dal fatto che maggiore è la varietà di batteri che li compongono e maggiore tenderà ad essere la variabilità del titolo letto dagli strumenti (la presenza di materiale corpuscolato incide fortemente sul conteggio in funzione del livello di discriminante dello strumento).

In conclusione quindi darei per scontato che indipendentemente da come si intende agire, il meccanismo della conversione comporta , l'accettazione di un margine di errore (incertezza del risultato finale) molto elevato e che tra le cause principali di ciò non dovremmo mettere la zona di produzione del latte. Mi sembra quindi realistico



affermare che una modalità di **conversione “nazionale”, perlomeno per i laboratori IZS, comporti complessivamente più vantaggi che svantaggi** (sia dal punto di vista tecnico-scientifico che pratico).

LABORATORI E STRUMENTI

In base alle risposte ottenute a specifica richiesta , considerando un unico Laboratorio per ciascun IZS, la dotazione attuale degli strumenti per la determinazione della carica batterica è la seguente :

IZSLER – Bactoscan 8000 (in fase di dismissione)
IZSUM - Bactoscan 8000
IZSPLV – Bactoscan 8000 (Bactoscan FC presso Lab. ARAP & C.C.)
IZSLT – Bactoscan FC
IZSPB – Bactoscan FC
IZSSI - Bactoscan FC
IZSAM – Bactoscan FC
IZSME - Bactoscan FC
IZSVE - Non utilizza strumenti Bactoscan (campioni ufficiali a IZSLER)
l'IZSSA - Non utilizza strumenti Bactoscan

Al di là del numero di Laboratori e strumenti complessivo le tipologie di conversione non sono quindi numerosissime, pertanto ho ritenuto utile prendere in considerazione anche alcune modalità di conversione in uso presso Laboratori esterni alla rete degli IZS ma che, per mole di lavoro, hanno comunque una notevole rilevanza regionale; con questi laboratori sono del resto in corso contatti e collaborazioni (Associazione Regionale Allevatori Lombardia Bactoscan FC, Granarolo Bactoscan FC, Federazione Latterie Alto Adige Bactoscan FC) .

Una considerazione simile può essere fatta per il rapporto tra IZS di Torino ed i due Laboratori esterni che eseguono le analisi per il pagamento qualità, o per i campioni ufficiali che IZSVE invia a Brescia.

MODALITA' DI CONVERSIONE

Il rapporto di conversione può essere espresso matematicamente da equazioni di tipo quadratico o lineare (curve o rette). In pratica le pubblicazioni sull'argomento hanno finora evidenziato che la relazione lineare esprime sufficientemente bene la relazione tra i due metodi (più precisamente è stato evidenziato che le relazioni non lineari non danno miglioramenti significativi della correlazione tra i due metodi) . Già questa considerazione fornisce elementi utili a comprendere che il livello di incertezza residua delle conversioni è comunque elevato.

Di fatto tutti i laboratori hanno adottato una relazione lineare nella cui applicazione pratica (inserimento dei valori numerici nel software dello strumento) si sono però introdotte variazioni più o meno consistenti di adattamento a situazioni specifiche (soprattutto per le fasce molto basse o molto alte di contaminazione batterica).

Ciò è stato fatto sostanzialmente per due motivi :

- 1- compensazione della perdita di linearità dello strumento sui valori estremi consentendo quindi di migliorare l'accuratezza nelle aree estreme del campo di misura
- 2- finalità pratiche di gestione dei dati al limite del range di misura e/o adeguamenti a specifiche situazioni da collegarsi al rapporto con i dati storici di un determinato bacino d'utenza.

In sintesi quindi pur esistendo delle rette di riferimento , la conversione reale applicata è sempre rappresentata da linee spezzate in cui il rapporto di conversione varia, anche se di poco, a seconda del livello di contaminazione batterica. Quest'ultimo aspetto relativamente poco importante dal punto di vista pratico, introduce però un ulteriore elemento di difficoltà nel lavoro di confronto : una cosa è confrontare rette di regressione , altre cosa linee spezzate in modo variabile a seconda del livello di carica batterica.

Nota : *il software dello strumento gestisce queste “fasce” con l'interpolazione logaritmica sul valore centrale di ciascuna fascia. Senza entrare nei dettagli la conseguenza principale è che la conversione dei dati risente ANCHE , dell'ampiezza della fascia a cui appartiene; con differenze molto piccole o trascurabili in caso di numerose fasce di limitata ampiezza , e differenze via via crescenti al crescere dell'ampiezza delle fasce.*

In termini pratici (vale a dire sul valore finale di UFC/ml che ciascun laboratorio emette) quest'ultima fonte di variabilità ha di fatto un peso estremamente limitato, ma per quanto riguarda l'analisi statistica delle funzioni di conversione anche quest'aspetto complica le possibilità di indagine .

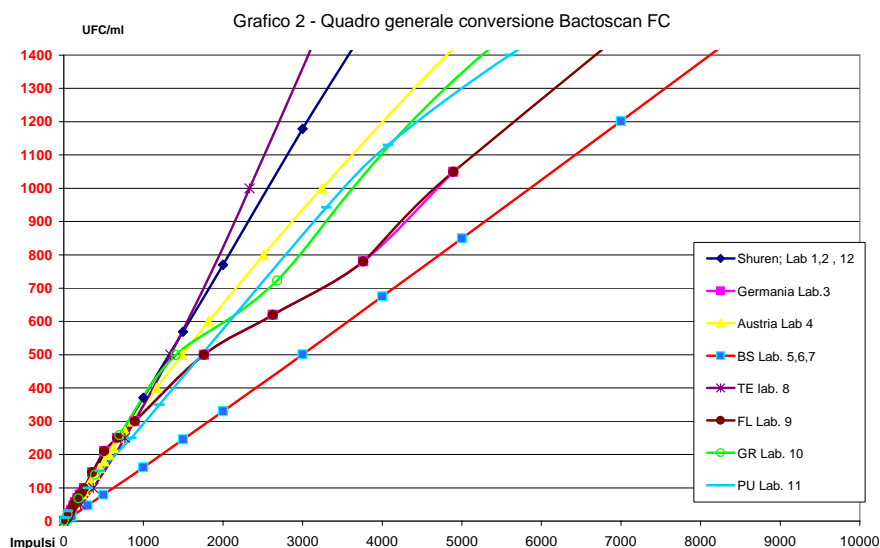
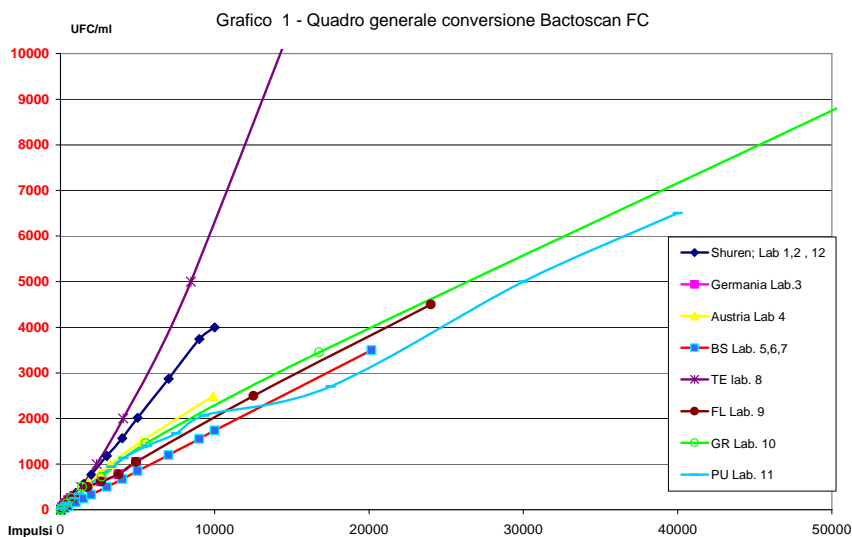
E' questo del resto l'elemento che, insieme al fatto che il range di misura è estremamente ampio (virtualmente da 1.000 a 99.999.999 UFC/ml), rende necessario per l' analisi statistiche lavorare su dati trasformati in forma logaritmica.

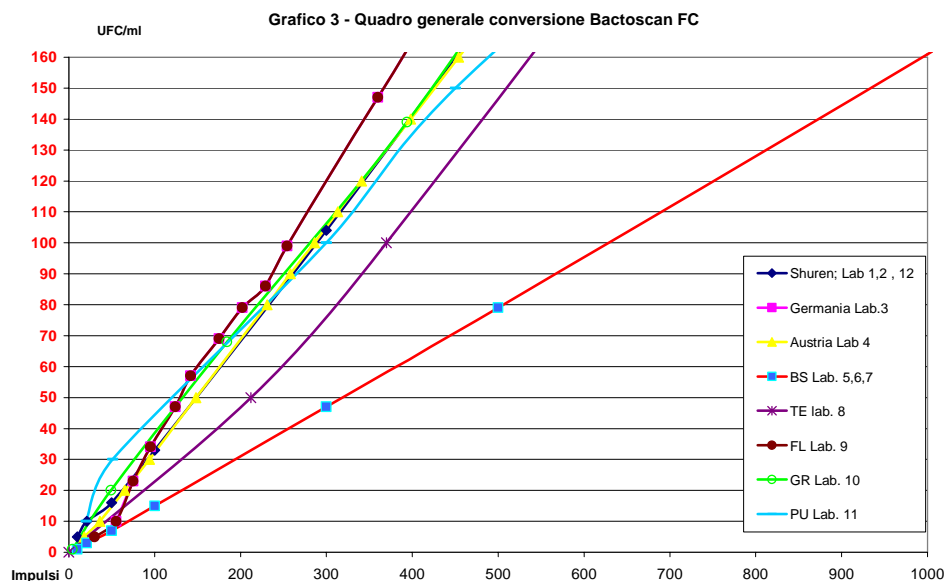


Tutto quanto detto finora è forse molto più semplicemente apprezzabile dalla rappresentazione del Grafico n°1 in cui sono inserite alcune delle modalità di conversione attualmente in uso per Bactoscan FC .

N.B.: in tutti i grafici i valori dell'asse Y vanno considerati espressi in UFC/ml x 1.000

Ancor più indicativi sono i Grafici n° 2 e 3 che focalizzano la situazione su valori di carica batterica più bassi ed in particolare su quelli più rilevanti dal punto di vista pratico (Graf N° 3 attorno a 100.000 UFC/ml). Non è difficile apprezzare che a parità di impulsi (quindi dando per scontato che la situazione degli strumenti sia ottimale ed uniforme nei vari laboratori) il risultato emesso può differire enormemente nei diversi laboratori (ad esempio per un valore di una carica batterica di 100 UFC/ml può originare, a seconda della conversione adottata, da una quantità di Impulsi di circa 250 fino a circa 630; le differenze si ampliano notevolmente se ci si riferisce a contaminazioni superiori).





Se limitiamo l'analisi ai laboratori italiani (Grafici n° 4 e 5), possiamo dire che la situazione rimane tutto sommato la stessa. In quest'ambito 2 delle modalità di conversione sono quelle adottate in comune da più laboratori e sono le uniche che hanno, a mia conoscenza, riferimenti in letteratura (Lab 1 e 2, 12 "Shuren", Lab 5,6,7 "BS").

Nota: per evitare ulteriori complicazioni nei grafici di confronto è stata utilizzata la formula originale della retta "Shuren". In realtà nel corso degli anni la retta è stata modificata e l'ultima versione pubblicata nel 2005 è quella che dovrebbe costituire il riferimento per i confronti. Di fatto però almeno in una parte degli strumenti in uso in Italia è adottata la versione originale. Evidentemente, al di là delle finalità del presente documento, nel momento in cui si dovesse condurre un'analisi statistica di confronto tra le rette verranno utilizzati i dati aggiornati (come è stato fatto, ad esempio, in Fig.2).

Nota: un confronto tra le due rette è stato già realizzato nel 2000 (vedi figura 1 quale esempio in cui i dati sono in scala logaritmica) evidenziando che a fronte di un andamento complessivo simile esisteva una differenza pressoché fissa lungo tutto il range di valutazione nel senso di una sottostima della curva BS (o sovrastima di quella tedesca). Proprio l'esistenza di una differenza costante permetteva di ipotizzare già da allora la possibilità di tracciare una retta intermedia come sintesi delle due esperienze, ma rimaneva comunque impossibile chiarire se tale differenza dipendesse da un errore sistematico nella esecuzione del metodo di riferimento da parte di uno dei due laboratori, oppure ad una reale diversa composizione della flora contaminante del latte analizzato nelle due realtà nazionali. Se il confronto venisse ripetuto oggi con l'equazione più aggiornata della retta "Shuren" otterremmo una riduzione dello scarto costante ma, purtroppo, una minor rispondenza nella pendenza a complicare la situazione. Tale ipotesi non era invece applicabile, ad esempio, alla conversione pubblicata da Trossat che differiva sensibilmente dalle altre due anche in termini di pendenza.

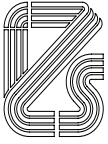


Grafico 4 - Conversione Bactoscan FC - solo alcuni lab italia

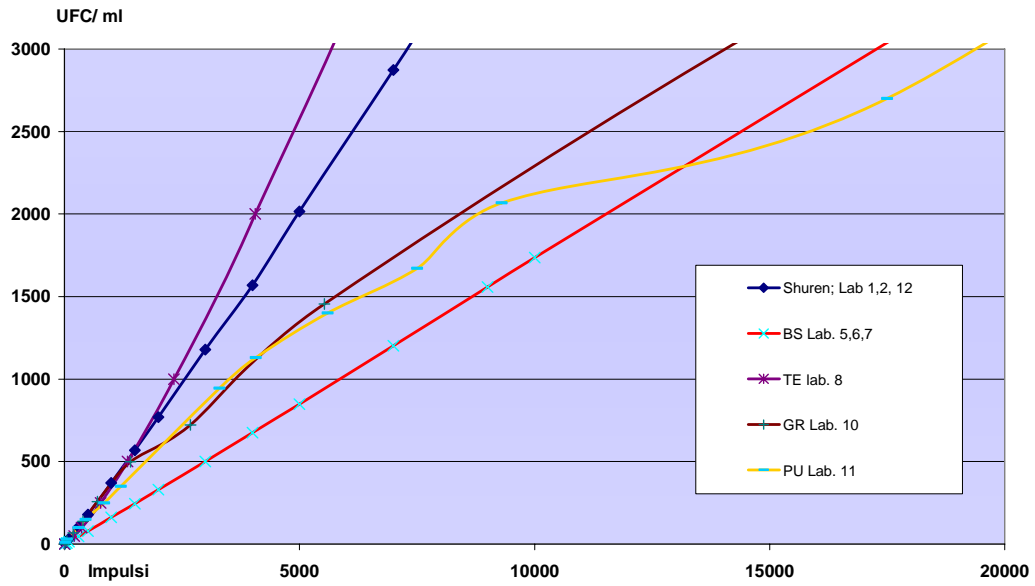


Grafico 5 - Conversione Bactoscan FC - solo alcuni lab italia

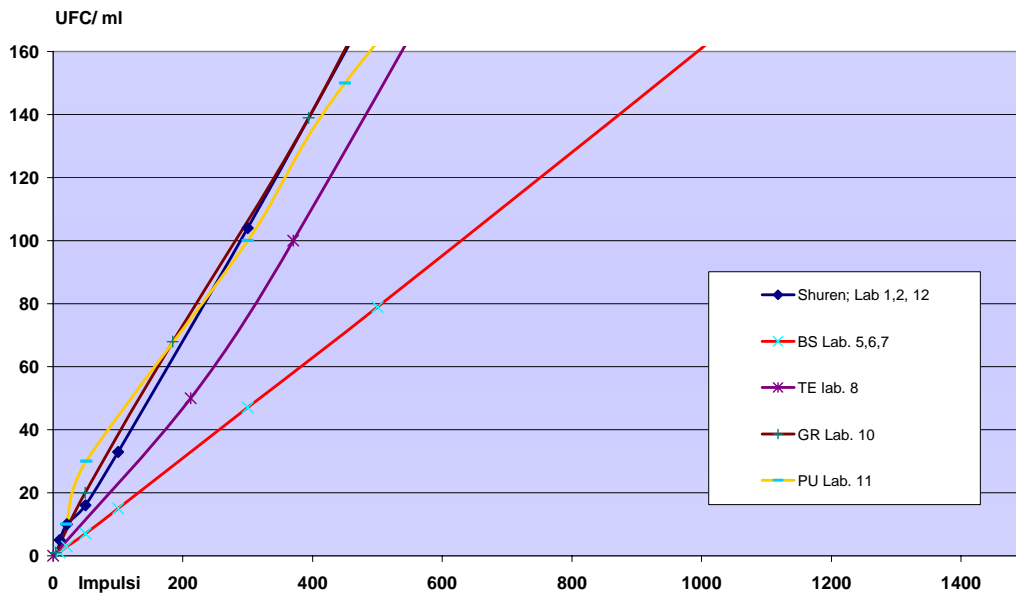
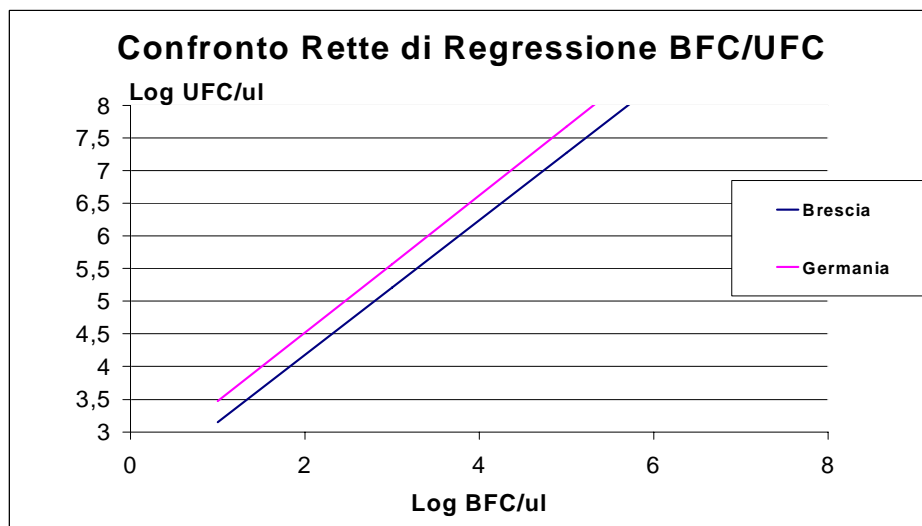




Fig. 1 – Confronto Rette BS e Shuren – (Il latte (2001) , 26 (10), p. 136-14)



CONFRONTO MODALITA' DI CONVERSIONE

Come già accennato l'adozione di una retta di conversione prevederebbe l'inserimento di una sola copia di valori nel software strumentale (il fattore di conversione è unico lungo tutto il range di misura), mentre nella pratica ogni laboratorio utilizza in misura più o meno evidente differenti "fasce" di conversione come è evidenziabile anche nei grafici precedenti. Per questo motivo la valutazione di confronto dovrebbe essere differenziata :

- dal punto di vista statistico il confronto si basa sulle equazione della retta di riferimento con i dati trasformati in termini logaritmici
- dal punto di vista pratico è possibile confrontare , per singola fascia, l'effetto determinato sul risultato espresso in UF

Nel primo caso l'ostacolo maggiore è che anche quando siano note le equazione delle rette, non si dispone dei dati grezzi dai quali le rette derivano (in particolare dello scarto residuo) . Nel secondo caso la maggior difficoltà risiede invece nel fatto, già accennato, che il software strumentale di conversione opera una interpolazione logaritmica sui dati in funzione dei punti estremi di ciascuna fascia rispetto al valore centrale; in termini pratici ciò significa che a seconda del numero di fasce utilizzate e , soprattutto, della loro ampiezza il valore numerico espresso in UFC sarà più o meno diverso da quello ottenibile applicando in modo costante l'equazione della retta scelta come riferimento.

In conclusione quindi ricordiamo che nel confronto fra conversioni IBC-CFU, si trascura spesso che qualsiasi regressione lineare porta alla definizione di "stime" della variabile dipendente (CFU) sulla base di valori assunti dalla variabile indipendente (IBC). A tali valori "stimati" è necessario associare l'incertezza della stima, per fornire un quadro esatto del processo di conversione. Di fatto gli stessi parametri della curva di regressione (nel caso di una retta, la pendenza e l'intercetta all'origine) sono "stime" dei parametri "veri", ed anche ad esse andrebbe quindi associata l'incertezza di stima (generalmente riportata come Errore Standard dei coefficienti di regressione).

Prendendo in considerazione la sola pendenza della retta , la sua varianza è direttamente proporzionale alla varianza residua delle stime (CFU) ed inversamente proporzionale alla devianza della variabile indipendente (IBC)

La varianza residua di stima esprime sostanzialmente l'incertezza associata ad una determinata stima (in CFU), dato un certo valore di IBC. La devianza della variabile indipendente (o somma degli scarti al quadrato di ogni osservazione in x dalla media di x) cresce proporzionalmente all'aumentare del numero di osservazioni (campioni utilizzati per la stima della regressione) ed alla dispersione in termini di IBC rispetto alla loro media)

In sintesi quindi la precisione della stima della pendenza di una retta di regressione fra IBC (x) e CFU (y) è tanto più affidabile quanti più campioni sono stati utilizzati per calcolarla e quanto più dispersi erano i valori di IBC in tutto il range di misura strumentale in cui è garantita la linearità di risposta.

La precisione della stima della pendenza della retta quindi diminuisce in presenza di una elevata dispersione (varianza residua di stima) dei valori di y (CFU osservate) intorno alla loro media stimata dalla regressione (CFU stimate), per un dato valore di x (IBC).



Raramente tutti questi parametri vengono resi disponibili per una completa valutazione della retta stimata, anche nei lavori di più recente pubblicazione in cui si evidenziano numerosi elementi di possibile influenza sulla conversione oppure si confrontano diverse modalità di conversione, ma senza mai disporre degli elementi essenziali per un confronto statisticamente sostenibile e cioè della variabilità delle stime.

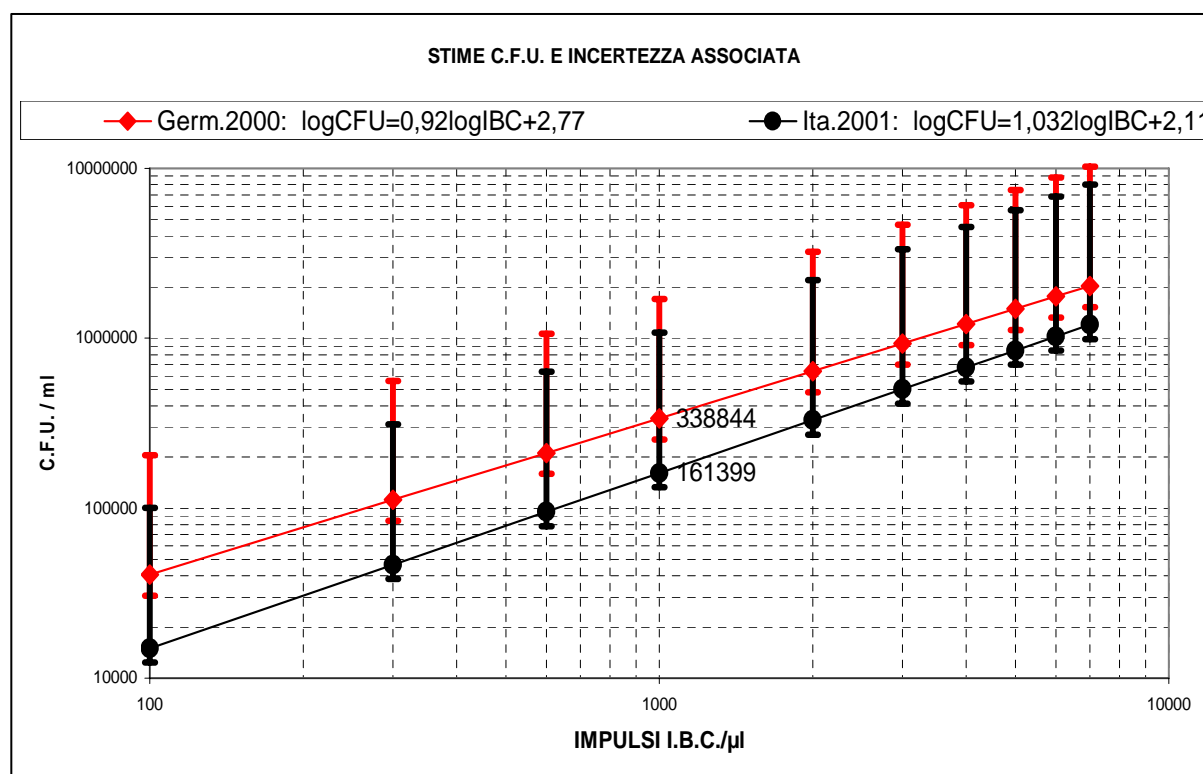
Quando ciò è possibile si ottiene comunque una stima di incertezza decisamente ampia.

A titolo di esempio si riporta di seguito un confronto grafico tra le due rette attualmente più utilizzate dai nostri Laboratori (In questo caso la retta indicata come "Germ." è la versione modificata nel 2002 e confermata poi nel 2005 da G. Shuren).

Pur avendo inserito come indicatore di variabilità della stima quello medio di tutta la retta (vale a dire quello calcolato su tutte le osservazioni messe insieme) è abbastanza evidente che anche quando la differenza tra i valori sia elevata, i margini di variabilità tendono a sovrapporsi o comunque ad avere ampi spazi di coincidenza.

Detto in parole povere " anche tra due rette significativamente diverse la probabilità che vi siano valori coincidenti nella determinazione con il metodo di riferimento è tutt'altro che limitata" e ciò conferma in sostanza che dovendo lavorare con variabilità così ampie i punti certi sono davvero pochi fino a poter affermare addirittura che le due rette invece NON sono significativamente differenti !!!!!.

Fig. 2 _ esempio di confronto tra rette di conversione tenendo conto dell'incertezza associata media .



Se il confronto dovesse riguardare una valutazione di significatività della differenza fra due dati stimati con le diverse rette o (peggio ancora) della differenza fra una stima di CFU ed un limite normativo, sarebbe arduo, in presenza di livelli di dispersione così alti, confermare l'ipotesi di differenza significativa. Per inciso tutte le rette fino ad ora pubblicate hanno presentato errori di stima compresi fra 0,25 e 0,40 log10, cioè comparabili a quelli dichiarati per le due rette in oggetto.

In una condizione di così elevata variabilità oggettiva (in grandissima parte non eliminabile) anche differenze in apparenza inaccettabili dal punto di vista pratico, potrebbero non esserlo dal punto di vista statistico. Affermare che due conversioni sono significativamente differenti dal punto di vista statistico non significa quindi nel caso specifico confermare che la flora del latte analizzato avesse caratteristiche diverse in termini di composizione.



Come dimostra il grafico precedente, e comunque sostenibile in modo ben più completo con analisi statistiche ad hoc, la variabilità delle stime è tale che una parte delle valutazioni risulterebbe coincidente anche tra rette significativamente diverse, così come assumendo una unica conversione..... mettiamo assieme valori di CFU tra loro estremamente diversi pur derivando dal medesimo latte e dal medesimo laboratorio.

IPOTESI DI LAVORO

Tra le numerose possibili varianti di approccio al problema ho ritenuto di poter schematicamente sintetizzare le seguenti tipologie:

IPOTESI 1 : Stime Interpolazioni Cumulative – (approccio pratico)

Assumere tutte le tabelle in uso come equivalenti (eventualmente estesa a Lab. Non IZS), rappresentare graficamente per punti le copie di valori Impulso/UFC inseriti negli strumenti e derivare da questo insieme, una retta di regressione unica .

IPOTESI 2 : Rette Interpolazioni Cumulative – (approccio opportunistico)

Assumere che le rette ufficialmente disponibili siano equivalenti in termini di precisione e dedurre da queste una “retta intermedia”

IPOTESI 3 : Rette documentate, mixing selettivo – (approccio statistico)

Unificare i dati originali delle sperimentazioni che i singoli laboratori hanno realizzato , comprendendo anche quelli pubblicati in letteratura e, se disponibili quelle di laboratori non IZS. Selezionarli o pesarli in funzione di criteri di precisione delle procedure adottate e delle modalità di sperimentazione .

Utilizzare quindi questa nuova base dati per la elaborazione di una nuova retta di regressione che rappresenti tutte le realtà sperimentali .

IPOTESI 4 : Ripetizione percorso sperimentale – (approccio di rivalidazione)

Programmare un lavoro sperimentale ad hoc in cui singoli laboratori realizzino una serie di prove in doppio secondo procedure e metodiche predefinite analizzando latte della propria realtà territoriale. Elaborare statisticamente la nuova base dati ed ottenere una retta di regressione nazionale

IPOTESI 5 : Selezione retta unica predefinita – (approccio rapido)

Di comune accordo si decide di assumere da una determinata data in poi un’ unica retta in tutti i Laboratori IZS, scelta tra quelle che attualmente dispongono di una validazione senza pretendere di scegliere quella più corretta ma semplicemente un riferimento unico

Nota: ovviamente ulteriori ipotesi di lavoro sono ben accette e possono venir proposte, così come è prevedibile che si opti per una scelta intermedia tra più proposte o che si modifichino parzialmente quelle precedenti.

Ognuna delle ipotesi presenta ovviamente aspetti positivi e negativi che è opportuno considerare:

IPOTESI 1 -. Vantaggi : lavoro poco impegnativo, permette di fotografare la situazione attuale in modo pratico e reale e derivarne una relazione che rappresenta davvero la media di tutti i laboratori,

Svantaggi : le attuali tabelle sono frutto di interventi in alcuni casi non scientificamente determinati , ma indotti da problematiche pratiche, tecniche, di storicità ecc. Il loro assemblamento non permetterebbe quindi di differenziare la loro “validità scientifica” dando a tutti ugual rilevanza senza poter distinguere tra più o meno “attendibili” o accurati e ciò avrà un peso nei confronti dei clienti o, ad esempio, di Enti di Accreditamento . Staticamente si tratta di una operazione non lecita.

IPOTESI 2 - Vantaggi : le rette da confrontare non sono poi molte (anche aggiungendo le conversione di IZS Bari e

Teramo per le quali non dispongo attualmente di indicazioni precise) se ci si limita a quelle in uso in Italia; la conversione ottenibile dovrebbe inoltre essere quella più “vicina” all’insieme delle modalità di conversione in uso in termini di riferimenti teorici .

Svantaggi : il concetto di retta di regressione intermedia non è statisticamente sostenibile, ed inoltre si dovrebbe dare un ugual peso a rette ottenute su latte “straniero” rispetto a quello italiano (che non ritengo un vero e proprio limite, ma è rilevante dal punto di vista formale). Si dovrebbero trascurare alcune modalità di conversione attualmente in uso , ma non “documentate” e quindi per qualche laboratorio la differenza con la retta intermedia potrebbe essere rilevante.

IPOTESI 3- Vantaggi : la nuova retta avrebbe un supporto scientifico sostenibile , probabilmente idoneo alle esigenze di accreditamento.

Svantaggi : la realizzazione appare decisamente difficile , sia perché non è semplice applicare criteri selettivi sui dati sperimentali (basti pensare a come considerare l’errore residuo che ciascuna retta comporta e che varia al variare del livello di contaminazione batterica) sia perché , ammesso che essi siano resi disponibili, derivano di fatto da situazioni operative decisamente differenziate con fonti di variabilità



di difficile individuazione; il rischio quindi è quello che la retta risultante, pur se statisticamente rappresentativa dell'insieme da cui deriva, appaia diversa da tutte le altre e quindi che il cambiamento risulti rilevante per tutti i Laboratori.

- IPOTESI 4 -** Vantaggi : una volta realizzato il lavoro risulterebbe perfetto sia nei confronti dei clienti che delle esigenze di Enti Accreditanti (in pratica si tratta di una rivalidazione del metodo), inoltre rispetterebbe l'esigenza di rappresentare diverse realtà locali.
Svantaggi : il lavoro VA FATTO !. Aldilà di possibili progetti di ricerca per i quali comunque i tempi non potrebbero essere brevi si tratta di un lavoro piuttosto corposo se fatto secondo procedure FIL; è possibile inoltre che il risultato si discosti notevolmente dalle rette attualmente in uso .
IPOTESI 4 BIS – Il lavoro da fare dovrebbe svilupparsi in un lungo arco di tempo (minimo 1 anno) e fornire una sorta di raffinazione progressiva della retta; la soluzione non sarebbe dunque disponibile in breve tempo a meno che non si decida di assumere l'ipotesi 5 come partenza e l'ipotesi 4 Bis come sviluppo nel corso dell'anno.
- IPOTESI 5 -** Vantaggi : presa la decisione comune , il lavoro è già fatto e potrebbe richiedere semplicemente una verifica , è inoltre una scelta idonea per l'Accreditamento. Potrebbe anche essere assunta come decisione temporanea in attesa di realizzare il lavoro previsto dall'ipotesi precedente.
Svantaggi : è una scelta che comporta un netto cambiamento soltanto per un gruppo di IZS e quasi nessun cambiamento per un altro gruppo. La decisione sui criteri di scelta non si presenta pertanto facile.

E' evidente che ognuna delle ipotesi precedenti dovrebbe essere ulteriormente definita e specificata nei particolari (solo per fare un esempio potrebbe essere opportuno scegliere una retta di conversione da applicare soltanto entro il campo di misura in cui è garantita la massima linearità dello strumento e delegare a conversioni “specifiche” i valori massimi e minimi di contaminazione).

In qualunque modo si intenda procedere penso sia bene richiamare ancora il concetto che nel caso di creazione di rette intermedie si dovrà accettare di assumere un errore residuo decisamente ampio in alcuni casi sicuramente più ampio di quello ottenibile con rette “personalizzate” ; questo aspetto è controbilanciato dal fatto che il cambiamento rispetto al passato dovrebbe essere di entità simile per tutti i laboratori.

Al contrario l'adozione di una retta predefinita così come la creazione di una retta nuova determinerebbero cambiamenti rispetto al passato di entità diversa a seconda del laboratorio. Nulla vieta comunque una volta adottata la conversione comune, che si inseriscano poi leggere modifiche “fatte in casa” definite da prove sperimentali, oppure giustificate da situazioni specifiche locali quali per esempio contaminazioni particolarmente elevate nei campioni.

INDICAZIONE PERSONALE

Indipendentemente dalla funzione di Centro di Referenza credo sia opportuno segnalarvi che nell'ambito del Laboratorio Latte IZSLER dovendo a breve abbandonare il Bactoscan 8000 , dovremo affrontare direttamente la problematica di cui sopra. E' nostra intenzione adottare fin dall'inizio la retta di conversione da noi pubblicata nel 2000 e avviare fin da subito una serie di controlli in doppio con il metodo di riferimento i cui risultati saranno cumulati a quelli del lavoro iniziale (che ovviamente abbiamo disponibili in forma grezza).

L'intenzione è di verificare celermente se sia necessario eseguire delle progressive modifiche alla retta originale come sembra molto probabile. .

Ho inserito questa indicazione personale non tanto per influenzare la scelta delle ipotesi di lavoro precedente , quanto invece per chiamare l'attenzione sul fatto che dovendo organizzare questa tipo di lavoro potrebbe essere quanto mai opportuno partire contemporaneamente con la collaborazione di altri Laboratori.

CONCLUSIONI

La necessità di una modalità di conversione comune è, a mio avviso, evidente. Ho cercato di sottolineare che ciò è anche decisamente opportuno per tutti gli operatori del settore (la conversione unica renderebbe più semplici i rapporti con gli Enti di accreditamento, con le Autorità Sanitarie, con le parti coinvolte nei sistemi di pagamento differenziato). Il lavoro che è necessario realizzare dipende nella sua entità dalle scelte che faremo e dovrà comunque essere confrontato con i vantaggi ottenibili ; ogni laboratorio attualmente dispone in fondo di una modalità di conversione che “funziona” ed alla quale la realtà locale si è adattata e il cambiamento , qualunque esso sia, potrebbe risultare inizialmente oneroso..



Pertanto ritengo che soltanto minimizzando i cambiamenti rispetto alle situazioni storiche e riducendo l'impatto del lavoro sperimentale per ciascun laboratorio diventi sostenibile la scelta di uniformare le conversioni dando così una soluzione ad un problema ormai definibile come "storico".

D'altra parte è importante sottolineare che condividendo la necessità e l'utilità della conversione comune ciascun laboratorio non si troverebbe solo ad affrontare gli effetti del cambiamento, piccolo o grande che sia, in quanto condiviso ed ufficializzato perlomeno nell'ambito degli IZS.

CONCLUSIONE OPERATIVA

Si richiede a ciascun laboratorio (IZS , e facoltativamente a coloro cui la relazione è inviata per conoscenza e cointeressamento) l'invio di una breve relazione in cui venga specificato :

- 1- Equazione della retta di riferimento in uso (alcuni hanno infatti inviato i dati inseriti nelle tabelle che non equivalgono ad una equazione)
- 2- Tipo di lavoro svolto per la definizione della retta, se esistente, (modalità numero di campioni risultati analisi statistica ecc.ecc.)
- 3- Opinioni ed indicazioni in merito alle ipotesi di lavoro formulate e disponibilità a partecipare ai lavori
- 4- Ipotesi di lavoro/soluzione alternative
- 5- Disponibilità ad un incontro sul tema che gradirei organizzare al più presto . In alternativa si potrebbe approfittare dell'annuale incontro A.I.A. Lab. Standard Latte

Mi permetto di richiedere la massima celerità delle risposte in quanto il tempo intercorso dall'avvio di questa analisi del problema è purtroppo , anche e soprattutto per colpa mia, già moltissimo.

BIBLIGRAFIA CONSULTATA _

- | | | | |
|----|---|---|--|
| 1 | Kieler Milchwirtschaftliche Forsch. 50, 249-257 (1998) | First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk | G. Suhren, H.-G. Walte |
| 2 | Milchwissenschaft 56 (7) 2001 | Bacteriological quality of raw milk: conversion of Bactoscan-FC counts onto the scale of the official method | G. Suhren, J. Reichmuth, H.-G. Walte |
| 3 | Bulletin of the IDF n° 383 | Experiences with the introduction of the BactoScan FC in Slovakia | M. Tomaska G. Suhren |
| 4 | Milchwissenschaft 59 (5/6), 261-262 (2004) | Verification study on Bactoscan FC counts conversion onto the scale of the reference method | M. Tomaska G. Suhren |
| 5 | Milchwissenschaft- M.S.Int., (2), Februar 2000, 67-70 | Evaluation of the Bactoscan FC.1. Accuracy, comparison with Bactoscan 8000 and somatic cells effect | Bolzoni G., Marcolini A., Varisco G |
| 6 | Milchwissenschaft- M. S. Int., (56), n° 6 June 2001, p. 318-321 | Evaluation of Bactoscan FC. Second Part: Stability, Linearity, Repeteability and Carry-over. | Bolzoni G., Marcolini A., Varisco G |
| 7 | .Ed. Cecalait, 11-27 (1998) | Evaluation of Bactoscan FC | Trossat PH., Leray E., Rollier P. |
| 8 | Milchwissenschaft 60 (1) , 28-31 (2005) | Bacteriological raw-milk quality: Factors influencing the relationship between colony-forming units and BactoScan FC counts | H.-G. Walte, G. Suhren, J. Reichmut Surhen G. |
| 9 | Bulletin of the FIL-IDF 330, 37-51 (1997) | | |
| 10 | Milchwissenschaft 57 (7) , 380 - 387 | Bacteriological quality of raw milk: Conversion of bactoscan-FC counts onto the scale of the official method | Shuren G., Reichmunth J., Walte H.G. |