



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**  
**“BRUNO UBERTINI”**  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
**CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE QUALITÀ LATTE BOVINO  
BRESCIA**

Via Bianchi, 9  
25124 BRESCIA  
Tel. 030-22901  
Fax: 030-2425251

N.PROT .... (sigle) Da citare nelle risposte

Brescia, 30/05/09

**Centro di Referenza Nazionale Qualità latte Bovino**

Tel. 030 / 2290541. E-mail: [crn.qualita.latte@izsler.it](mailto:crn.qualita.latte@izsler.it)

**DOSSIER RISULTATI FINALI PROGETTO  
“UNIFICAZIONE CONVERSIONE BACTOSCAN FC”**

**VERSIONE RIDOTTA PRIVATA DELLE PARTI SPECIFICHE DI  
PERTINENZA DEI SINGOLI LABORATORI**

NOTA INFORMATIVA : il presente documento rappresenta un estratto del report finale del progetto denominato “UNIFICAZIONE CONVERSIONE BACTOSCAN FC” . In particolare sono state eliminate le parti riferite ai dati, all’elaborazione ed alle indicazioni riguardanti i singoli Laboratori che hanno partecipato ( PARTE 1) . Viene invece integralmente riportata la PARTE 2 dell’elaborato riguardante appunto l’analisi statistica dei dati e l’elaborazione della retta di regressione comune .

In questo modo anche i Laboratori che non hanno partecipato direttamente al progetto hanno la possibilità di conoscere il lavoro svolto, i risultati ottenuti, e quindi valutare l’opportunità di adottare la medesima modalità di conversione.

Lo scrivente Centro di Referenza è a disposizione per indicazioni , informazioni e supporto tecnico .



## PRESENTAZIONE

Il presente Documento riporta i risultati del Progetto denominato "Unificazione Conversione Bactoscan FC" realizzato nel corso del 2008 e finalizzato a raccogliere a livello nazionale gli elementi necessari ad elaborare una modalità comune per la conversione degli esiti analitici di carica batterica totale su latte crudo dall'unità di misura "Impulsi/ $\mu$ l" fornita dallo strumento Bactoscan FC ( Foss DK) all'unità di misura "Unità Formanti Colonia/ ml ". Nella **prima parte** viene presentato il risultato ottenuto dall'elaborazione statistica delle prove condotte da ciascun Laboratorio partecipante . Tale risultato ( sottoforma di retta di regressione) può rappresentare di per se una validazione della modalità di conversione realizzata su latte di origine locale , così come può essere utilizzato quale conferma / modifica / aggiornamento / verifica della modalità di conversione in uso presso il laboratorio . Nella **seconda parte** viene invece sviluppato il lavoro di elaborazione unica sul complesso dei risultati ottenuti dall'insieme dei Laboratori partecipanti. La modalità di conversione risultante ( retta di regressione) costituisce quindi una validazione congiunta idonea a rappresentare il prodotto nazionale e ad uniformare l'attività analitica dei Laboratori che la adotteranno.

Lo scrivente Centro di Referenza provvederà a monitorare gli effetti nel tempo e a verificare la validità della Conversione Unica nel prossimo futuro.

## PREMESSE INFORMATIVE

Nel presente testo si fa riferimento a quanto contenuto in alcuni documenti precedentemente emessi che contengono per esteso gli aspetti teorici dell'impostazione del Progetto e quelli relativi alle modalità di esecuzione delle prove. Tali documenti ( denominati "Conversione Bactoscan" e "Protocollo Operativo ") sono già in possesso dei Laboratori partecipanti, e sono comunque liberamente visionabili per esteso nel sito :

<http://www.izsler.it/Referenza/CREFLatte/Progetti.htm>

Al medesimo indirizzo sono inoltre disponibili gli Atti delle relazioni presentate nell'ambito del Convegno A.I.A. 2007 ( presentazione del progetto) e Workshop I.Z.S.L.E.R. 2008 ( presentazione dei risultati) riguardanti il medesimo tema.

## INTRODUZIONE

Secondo quanto previsto dal **protocollo operativo** ogni Laboratorio partecipante ha realizzato nel corso del 2008 una serie di test di confronto (previsti 100 campioni per Laboratorio) analizzando con le due metodiche campioni di latte crudo, bovino, di massa aziendale, refrigerato e possibilmente privo di conservante. Era previsto di eseguire una doppia determinazione con il Bactoscan FC e contemporaneamente provvedere alla semina in doppio su piastre di Plate Count Agar di almeno 3 diluizioni in base 10 del medesimo campione ( le diluizioni erano predeterminate in funzione del risultato previsto sulla base del numero di Impulsi forniti dallo strumento) . Nel medesimo protocollo operativo erano definite nello specifico sia la distribuzione indicativa del livello di contaminazione dei campioni da analizzare, che le modalità operative da seguire per la realizzazione delle analisi , sia infine i criteri da adottare per il conteggio delle colonie sulle piastre. Nel presente Documento vengono evidenziati unicamente gli eventuali aspetti procedurali che si sono scostati dal quanto previsto dal protocollo operativo.



## PARTE 1 ( PARZIALE)

### ANALISI DELLE PROVE CONDOTTE DAL SINGOLO LABORATORIO

LABORATORIO  
( Laboratorio n° X del Progetto)

Il Laboratorio ha comunicato gli esiti delle prove tramite foglio elettronico Microsoft®Excel 2000 , predisposto dallo scrivente Centro di Referenza nel quale sono riportate per ciascun campione analizzato le seguenti informazioni :

- identificativo univoco con chiave numerica o alfanumerica scelta a discrezione del laboratorio e univoca per ogni campione nella serie di dati trasmessi
- data analisi: data di esecuzione della prova
- valori di analisi metodo indiretto: due repliche eseguite su apparecchiatura Bactoscan FC in condizioni di ripetibilità (in presenza di più strumenti le repliche sono state eseguite nello stesso numero su tutti gli strumenti disponibili (condizioni di riproducibilità)
- Valori di analisi metodo riferimento: serie di conteggi ottenuti da tutte le piastre Petri seminate ai diversi livelli di diluizione .
- Informazioni aggiuntive circa gli esiti di altri parametri analitici eventualmente disponibili, la presenza di conservante, le eventuali diverse condizioni di conservazione del latte rispetto alla refrigerazione a 4-10 °C. , o ulteriori note informative a discrezione del laboratorio

Allegato al presente documento vengono forniti i dati selezionati per l'elaborazione statistica ( Vedi **ALLEGATO n° 1**). I dati considerati validi (vedi al Punto seguente) sono presenti sottoforma di valore medio , mentre i dati grezzi pervenuti sono archiviati informaticamente presso il Centro e comunque disponibili nel medesimo formato presso il singolo Laboratorio partecipante .

#### SELEZIONE DATI

Sulla base di quanto indicato in Rif. 1 punto 5.5.2. si è proceduto ad uno screening preliminare dei dati provenienti dal laboratorio, relativamente ai seguenti punti:

#### 1) Bactoscan FC: ripetibilità e riproducibilità dei dati

##### selezione dei dati

I criteri di selezione derivano dalle specifiche strumentali indicate in Rif 2, secondo le quali sono accettabili scarti di ripetibilità (due repliche sullo stesso strumento) e riproducibilità (due repliche fra due strumenti diversi) compatibili con i valori riportati in tabella 1.

Le tre classi fra 10 e 1000 IBC bactoscan FC derivano direttamente dai valori di rif. 2, mentre le due classi limite inferiore e superiore sono state aggiunte sulla base di considerazioni tecniche derivanti da dati pregressi e/o pubblicazioni. I valori di differenza critica tabulati ( $RD_{95}$ ) rappresentano la differenza massima accettabile fra repliche condotte in condizioni di ripetibilità o riproducibilità, su dati trasformati in  $\log_{10}$ , e sono calcolate secondo le indicazioni di rif. 3- Allegato B -.

I campioni che presentavano repliche eccedenti i limiti tabulati per la rispettiva classe (per ripetibilità o per riproducibilità) sono stati dichiarati anomali ed esclusi dall'elaborazione (**identificati con la sigla "R" nell'Allegato 1**)

##### Ripetibilità stimata per laboratorio

Indipendentemente dall'applicazione dei criteri di selezione predefiniti in tab. 1 ed applicati in modo comune per tutti i laboratori, si è proceduto a calcolare sui dati del singolo laboratorio la ripetibilità per singoli livelli di determinazione e quella complessiva, che costituiscono quindi una indicazione individuale della ripetibilità strumentale. Quando disponibili repliche per più strumenti la stima è stata condotta in maniera indipendente sulle due o più serie di dati. Ai fini del calcolo della Deviazione standard di ripetibilità si è proceduto secondo quanto indicato in rif. 9 al punto 6.1.3. applicando la formula sotto riportata, dove  $q$  è il numero di campioni analizzati in doppio e  $w$  lo scarto osservato fra le due repliche (dati in  $\log_{10}$ )



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

Ai fini della stima sono state preventivamente eliminate, dalla serie di dati di ciascun laboratorio, le coppie di valori che presentavano una varianza anomala secondo il test di Cochran, applicato in base alle indicazioni di rif. 10, punto 7.3.3.2.

La tabella 2 riporta i risultati di tale elaborazione, confrontabile con le specifiche strumentali attese di cui alla tabella 1

## 2) dati Bactoscan FC: rispetto dei limiti di quantificazione e del campo di misura

Considerato quanto riportato in rif 2 alla voce "campo di misura tipico" si è adottato come limite inferiore di selezione il valore di 5 IBC/μL. Per quanto riguarda il limite superiore, con riferimento a quanto precedentemente rilevato in rif.4 relativamente alla linearità strumentale, si è determinato di accettare conteggi fino a 5.0000 IBC/μL. I campioni che presentavano conteggi Bactoscan FC < 5 IBC/μL oppure > 50.0000 IBC/μL sono stati esclusi dall'elaborazione ( **identificati con la sigla "L" nell'Allegato 1** )

## 3) dati metodo riferimento: rispondenza dei conteggi ai criteri per il calcolo del valore

Le serie di risultati ( conteggi delle colonie per singola piastra) ottenuti con il Metodo della semina in piastra, sono state scrutinate in base al metodo di calcolo indicato in rif. 5 e tenuto conto di quanto previsto in rif. 7, per i quali si riportano a titolo informativo alcune delle indicazioni :

- Il numero massimo di colonie presenti su una singola piastra, per procedere al relativo conteggio, non deve eccedere il valore di 300
- Il numero minimo di colonie presenti su almeno una piastra delle due diluizioni consecutive utilizzate per il calcolo non deve essere inferiore a 15
- Sono utilizzabili anche le piastre con conteggi compresi fra 300 e 324, quando la successiva diluizione non presenta piastre con almeno 15 colonie, a condizione che il conteggio delle piastre di tale successiva diluizione non sia inferiore a 10 colonie.

Le diluizioni ritenute valide sono state impiegate ai fini del conteggio. Eventuali campioni per i quali non si disponeva di diluizioni valide sono stati esclusi dall'elaborazione ( **identificati con la sigla "A" nell'Allegato 1** ).

## 4) dati metodo riferimento: valutazione di omogeneità statistica dei risultati

Essendo stabilito nel protocollo operativo di non eseguire due repliche indipendenti con il metodo di riferimento (rif. 5), privilegiando il numero di diluizioni per ogni campione, si è operato uno screening dei dati secondo quanto indicato in rif 6- Allegato: "controllo dell'omogeneità di conteggio delle colonie microbiche "

La selezione è stata condotta ad un livello di significatività statistica del 99% e valutando unicamente la sovradisersione globale della serie di piastre (test  $Gp^2$  ), trascurando la sola dispersione fra diluizioni e la sottodispersione globale. Il risultato del test è stato adottato come criterio discriminante quando le specifiche di selezione di cui al punto 3 consentivano la scelta di serie di diluizioni diverse.

I campioni che presentavano un superamento del valore limite per il test sono stati esclusi dall'elaborazione ( **identificati con la sigla "G" nell'Allegato 1** )

La tabella 3 riporta alcune statistiche descrittive dei dati validi utilizzati per la stima della relazione, così come selezionati in base ai criteri precedenti.

## MODELLO DELLA RELAZIONE E RELATIVI CALCOLI

Sulla base di quanto indicato in rif.1, punto 5.5.1., si è adottato un modello di regressione lineare per stabilire la relazione fra metodo di riferimento e metodo di routine.

Tutti i dati validi rimasti dopo lo screening precedentemente descritto, sono stati trasformati in log10 prima di procedere ai calcoli, sia per il metodo di routine che per il metodo di riferimento. Tutti i dati di IBC disponibili per ogni campione sono stati mediati prima della trasformazione, indipendentemente dal numero di repliche disponibili e dal numero di strumenti utilizzati.

Per la stima dei parametri di regressione lineare si è determinato di considerare come variabile



dipendente (Y) il metodo di riferimento (U.F.C./mL) e come variabile indipendente (X) il metodo di routine Bactoscan FC (IBC/ $\mu$ L). L'assegnazione alla variabile dipendente dei valori del metodo di riferimento è prevista in rif.1, punto 5.5.1., in considerazione del maggior errore di ripetibilità atteso ( $Sr = 0.088 \log_{10}$ , secondo quanto calcolabile dalle indicazioni in rif. 5, punto 10.2.2.), rispetto alle specifiche di ripetibilità del metodo di routine bactoscan FC.

I valori di UFC stimati dal Bactoscan derivano quindi dalla seguente equazione:

$$\text{Log}_{10}(\text{U.F.C.}) = a + b \cdot \text{Log}_{10}(\text{I.B.C.})$$

con a = intercetta della retta di regressione (in tab. 4 indicato come intercetta)

con b = coefficiente angolare della retta di regressione (in tab. 4 indicato come logIBC)

I calcoli sono stati condotti sulla base delle indicazioni in rif. 8, stimando i parametri di regressione secondo il criterio dei minimi quadrati (OLS regression), applicando per quanto possibile (in considerazione dell'assenza di doppia replica per il metodo di riferimento) le indicazioni di rif.8 Allegati R ed S, tenuto conto dello scambio delle variabili sugli assi X ed Y.

Per le stime dei parametri si è utilizzato un foglio di calcolo Microsoft®Excel 2000. Per omogeneità di espressione rispetto a quanto riportato in rif. 8 Allegato S, il report di regressione (tabella 4) è derivato dall'uso della macro Excel® accessibile dal menù strumenti→ analisi dei dati→ regressione.

La selezione degli outliers di regressione è stata condotta con il criterio definito in rif.1 punto 5.5.3., eliminando iterativamente i campioni che presentavano un residuo standardizzato di regressione maggiore di 2,58 in valore assoluto e ricalcolando la regressione fino a riscontrare l'assenza di nuovi outliers (**identificati nell' Allegato 1 con la sigla "S"**).

Il risultato complessivo dell'elaborazione dei dati ( distribuzione delle singole osservazioni e retta di regressione stimata) viene raffigurato nel grafico n° 1.1.

Nel grafico sono riportati anche i limiti di confidenza della retta stimata (P=95%) e l'intervallo di previsione o intervallo di confidenza della stima (P=95%), che consente di valutare l'errore di stima derivante dall'utilizzo della retta di regressione quando applicata ad una nuova osservazione di IBC/ $\mu$ L.

Il grafico 1.2 riporta, in funzione delle UFC/mL stimate, i residui standardizzati, cioè gli scarti fra valori di riferimento UFC/mL e stime UFC/mL dalla regressione, rapportati al loro scarto tipo. Dal grafico è possibile apprezzare eventuali tendenze di scostamento dalla linearità di relazione attesa. Le due linee inferiore e superiore sono tracciate al livello di 2.58, cut-off utilizzato per l'eliminazione degli outliers di regressione. Infine viene riportato in grafico 1.3 il confronto fra la retta stimata per il singolo laboratorio e quelle stimate in modo analogo per gli altri laboratori, per consentire una valutazione circa la propria collocazione rispetto all'insieme delle rette stimate.

## **ESPRESSIONE DEI RISULTATI**

### Tabella di conversione

La relazione ottenuta è quindi esprimibile dai parametri di regressione stimati e riportati nella relativa tabella ( Tabella 4). Ai fini applicativi viene riportata in forma di tabella di conversione per consentirne l'inserimento nel software strumentale (Tabella 5).

A tale scopo si è proceduto a stimare dalla regressione le due coppie di valori IBC/ $\mu$ L e UFC/mL corrispondenti ai due livelli limite di determinazione precedentemente ricordati: 5-50000 IBC/ $\mu$ L, e le due coppie di valori corrispondenti al minimo e massimo livello sperimentalmente analizzato dal laboratorio (IBC/ $\mu$ L). Di fatto il campo di validità della regressione dovrebbe essere rigidamente limitato all'effettivo campo di misura risultante dalla presente prova ( valore minimo e massimo dei campioni analizzati). Come verrà meglio precisato nella Parte 2 del presente documento, riteniamo comunque lecito estendere tale campo a quello considerato per la prova nel suo complesso anche in considerazione del fatto che esso è stato definito in funzione dei limiti di linearità strumentale sperimentalmente verificati in altri lavori.

L'elevato numero di cifre significative utilizzato nella suddetta Tabella, risulta necessario in quanto motivato dalla modalità di utilizzo dei parametri della retta di regressione da parte del Software associato allo strumento, che procede al ricalcolo della retta di regressione logaritmica all'interno di ciascun intervallo tabulato: eccessivi arrotondamenti (ad. esempio l'utilizzo delle sole 2 cifre



significative previste per l'espressione di risultati microbiologici) potrebbero portare al calcolo di coefficienti di regressione leggermente diversi da quelli stimati, con conseguenti ripercussioni sulle successive stime di UFC/mL.

#### Intervallo di confidenza della stima

In conformità a quanto riportato in rif. 8 punto R.6.1. i limiti di confidenza per un valore stimato  $\langle Y \rangle$  di UFC a partire da un punto X di IBC Bactoscan, sulla base della retta di regressione e dei relativi parametri, è espresso dalla relazione seguente

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

dove

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

con:

t = valore di t di Student per un livello di confidenza  $\alpha$  definito (solitamente 95%) e (N-2) g.d.l.

N = numero di campioni utilizzati per stimare la regressione

Vx = varianza dei valori di x (IBC) utilizzati per la stima della retta di regressione

Sy:x = errore residuo dalla regressione

per N sufficientemente grande (>100) il 2° e 3° membro sotto radice diventano trascurabili, t tende a 1.96 per P=95%, e la formula si semplifica in:

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

I limiti di confidenza della stima delle UFC a partire da una nuova osservazione di IBC ottenuta da una singola determinazione, e calcolata applicando la retta, esprimono sostanzialmente l'incertezza (al livello P definito) del valore stimato (vedere grafico 1.4, in cui facendo riferimento ad un laboratorio che ha eseguito più di 100 campioni è possibile visualizzare i limiti di confidenza della stima e raffrontarli con quelli attribuibili all'incertezza di misura del metodo di riferimento).

Ad ogni livello di X (100 IBC/ $\mu$ L nell'esempio grafico) corrisponde una distribuzione di valori in Y (metodo di riferimento) di tipo normale con media 0 e scarto tipo stimato dall'errore residuo di regressione Sy:x. L'intervallo di  $\pm 1.96S_{y:x}$  intorno al valore Y stimato dalla retta comprende circa il 95% dei valori di UFC/mL appartenenti alla relativa distribuzione. I limiti così definiti trovano un possibile impiego, ad esempio, nel confronto fra UFC stimate dal metodo indiretto ed UFC ottenute dal metodo di riferimento, su un singolo campione o su una popolazione di campioni, come indicato in rif. 1 punto 6. Nel grafico viene inoltre visualizzata la distribuzione teorica di valori, costruita intorno al livello di UFC/mL stimato, sulla base dello scarto tipo di riproducibilità dichiarato nel metodo di riferimento. (rif.5). Si sottolinea che, anche assumendo come priva d'errore ogni osservazione della variabile indipendente X, l'errore residuo di regressione non potrà mai risultare inferiore all'errore associato alla determinazione della variabile dipendente Y.

#### **NOTA DI SEGNALAZIONE PER IL LABORATORIO N° X**

Si segnala che l'analisi statistica dei dati ha evidenziato in particolare :

- numero campioni eseguiti : – numero campioni validi :
- distribuzione campioni -
- quantità anomali /scartati :
- uso conservante –
- campioni eliminati per Dev St. > 2,58
- sottodispersione o sovradispersione risultati Metodo di Rifeirmento
- errore di stima compatibile con le attese (0,25-0,30 log10) : S yx =
- caratteristiche pendenza ed intercetta rispetto alle altre : .



## **PARTE 2**

### **ELABORAZIONE MODALITA' DI CONVERSIONE UNICA**

#### **INTRODUZIONE**

Il progetto, come accennato all'inizio del presente documento, si pone l'obiettivo di esprimere, attraverso l'assemblamento di prove eseguite da differenti laboratori in differenti realtà territoriali, una modalità unica di conversione dei dati strumentali in equivalenti Unità Formanti Colonia.

Premessa teorica al progetto è la considerazione che l'origine geografica di un campione di latte rappresenti un indicatore decisamente superficiale delle differenze compositive della flora batterica contaminante il latte per quanto riguarda specificatamente la quantità di batteri delle differenti specie che partecipano a formare una colonia nel terreno di semina (perlomeno quando ci si riferisca a differenze geografiche in ambito nazionale).

La composizione media della flora contaminante è infatti sicuramente dipendente da numerosi fattori che, quantomeno in linea teorica, sono decisamente più influenti della generica zona geografica di origine del latte: dal tipo di allevamento (e quindi di lettiera e stabulazione) alle modalità di mungitura e conservazione del latte. Ma altrettanto importanti sono i fattori relativi al campionamento ( intervallo mungitura –analisi, stagionalità) alla conservazione ( temperatura, utilizzo conservanti) ed all'analisi (soprattutto agitazione dei campioni ) , la cui influenza è stata già indagata ed quantificata da diversi Autori nei decenni scorsi . Proprio in questo tipo di lavori si è evidenziato che questi fattori, pur se significativamente influenti sul rapporto Impulsi/UFC, risultano sostanzialmente impossibili da gestire In sede di analisi in quanto richiederebbero una continua modulazione della modalità di conversione quasi sul singolo campione .

Da tutto ciò discende abbastanza chiaramente che l'indicazione di riferire la modalità di conversione all'area geografica di competenza di ciascun laboratorio ( del resto non meglio definita in termini di spazio) fornita dalle Norme specifiche rappresenta una logica e necessaria scelta di compromesso finalizzata ad ottenere in maniera sostenibile una verifica delle caratteristiche medie dei campioni che ciascun laboratorio analizza, assumendo nel termine “medio” che l'insieme di tutti gli altri fattori condizionanti debba forzatamente essere considerato costante o comunque non influente.

Il margine di errore di stima ( quindi l'incertezza di misura finale dell'esito analitico) che il singolo Laboratorio deve comunque assumere come ineliminabile permane quindi in ogni caso estremamente elevato ( soprattutto nel caso di campioni le cui caratteristiche non siano tipicamente “medie” ) .

Tale errore di stima pertanto risulta, in ogni caso, di entità simile a quella che si accetta di assumere come ineliminabile nel caso si utilizzi una modalità di conversione su una base geografica più ampia , come può essere appunto quella nazionale. Nelle pagine seguenti questo aspetto teorico

( equivalenza complessiva dell'errore di stima ottenibile con le due diverse procedure ) è dimostrato in quanto la retta di conversione comune sviluppata, presenta caratteristiche ( in termini di errore di stima medio) sovrapponibili a quelle pubblicate in letteratura o presentate in questo lavoro da singoli Laboratori sul latte del proprio territorio. D'altra parte vanno sottolineati gli indubbi vantaggi , pratici e formali, che la disponibilità di una modalità di conversione comune fornisce all'insieme del sistema laboratoristico nazionale e la riduzione delle divergenze tra laboratori diversi soprattutto quando chiamati ad analizzare campioni provenienti da diverse realtà geografiche ( fenomeno ormai estremamente diffuso nell'attuale mercato lattiero-caseario) .

#### **LABORATORI PARTECIPANTI**

I Laboratori le cui prove sono state utilizzate per la seguente elaborazione statistica sono :

- I.Z.S.Lombardia ed Emilia Romagna - Lab. Brescia e Lab. Piacenza
- I.Z.S.Lazio e Toscana – Lab Roma e Lab. Grosseto
- I.Z.S.Sicilia – Lab. Palermo e Lab. Ragusa
- I.Z.S.Mezzogiorno – Lab. Caserta
- I.Z.S.Puglia e Basilicata – Lab. Bari e Lab. Potenza
- I.Z.S.Piemonte Liguria e V. Aosta – Lab. Torino
- I.Z.S.Umbria e Marche – Lab. Perugia –



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**  
**“BRUNO UBERTINI”**  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
**CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE QUALITÀ LATTE BOVINO  
BRESCIA**

Via Bianchi, 9  
25124 BRESCIA  
Tel. 030-22901  
Fax: 030-2425251

- Ass. Reg. All. Piemonte – Lab. Torino
- Ass. Reg. All. Friuli – Lab. Udine
- Centro Latte Ass. Reg. ALL. Val d'Aosta – Lab. Aosta
- Federazione Latterie Provincia di Bolzano- Lab. Bolzano

Al Progetto hanno aderito, pur non eseguendo prove analitiche, altri 7 Laboratori pubblici o privati , cointeressati al risultato finale .

**Dati utilizzati:**

il set di dati utilizzato per la stima della retta di conversione unica è derivato dai singoli set di dati forniti da ciascun laboratorio ( Parte 1) . Secondo i criteri di selezione già descritti nella prima parte del presente Documento :

- sono rimasti esclusi dall'elaborazione i campioni considerati anomali in funzione del conteggio strumentale ( ripetibilità e/o riproducibilità, mancato rispetto dei limiti di quantificazione e del campo di misura) o in funzione del risultato della semina in piastra (mancanza di conteggi validi o non proporzionalità ed omogeneità del set di diluizioni).
- Sono stati invece ricompresi nel set di dati i campioni dichiarati outliers per errore di stima  $Sy:x > 2,58$ , rispetto alla relativa retta di laboratorio; è infatti evidente che tale condizione dovrà essere rivalutata in funzione della nuova retta di regressione da stimare;

La tabella 6, riporta in forma sintetica le principali statistiche descrittive del complesso dei dati inizialmente presi in considerazione per l'elaborazione.

**Distribuzione dei dati**

L'analisi grafica della distribuzione delle osservazioni, eseguita sia sulla base dati complessiva che all'interno dei singoli gruppi ( laboratori) ha evidenziato l'addensamento delle osservazioni IBC sui valori intorno a 100 IBC/ $\mu$ L (Grafico 2.1). Tale situazione è in gran parte conseguente alla scelta programmatica di privilegiare l'analisi di campioni nel *range* di rilevazione prevalente nell'attività quotidiana dei Laboratori a livello nazionale ( tenuto conto anche della esistenza di un limite legale per la commercializzazione del latte definito dalla normativa vigente). Nella Tabella seguente viene illustrata la distribuzione programmata nel Protocollo Operativo come indicazione fornita ai singoli Laboratori, e quella poi realmente ottenuta considerando i soli campioni mantenuti per l'alaborazione finale ( il mancato rispetto della percentuale attesa nell'ultima fascia è conseguente alla decisione di eliminare i campioni eccedenti il limite massimo assunto per la linearità dello strumento , assunta soltanto in fase di elaborazione finale) :

<b>INTERVALLO IMPULSI</b>	<b>% PROGRAMMATA</b>	<b>% ESEGUITA Solo campioni validi</b>
0-20	<b>3</b>	<b>3,93</b>
21- 100	<b>30</b>	<b>29,8</b>
100-1000	<b>30</b>	<b>35,7</b>
1000-5000	<b>25</b>	<b>16,8</b>
5000-10000	<b>4</b>	<b>3,8</b>
10000-50000	<b>4</b>	<b>6,2</b>
50000- 99999	<b>4</b>	<b>1,7 ***</b>

Analogamente viene illustrata (Grafico 2.2) l'analisi della distribuzione dei dati espressi in UFC/mL. Riteniamo opportuno sottolineare che il lieve scostamento dal tracciato "normale" (Grafici 2.3 e 2.4) non costituisce elemento rilevante, non essendo obiettivo del presente lavoro l'inferenza sui parametri delle due popolazioni, bensì lo studio della relazione esistente tra di esse. Si riportano comunque , anche ad uso e consumo del singolo Laboratorio partecipante, i parametri distributivi in forma di boxplot all'interno dei vari gruppi (Grafici 2.5 e 2.6).





Si è infine proceduto all'analisi del diagramma di dispersione delle osservazioni (Grafico 2.7), dal quale risulta confermata l'adeguatezza della relazione lineare come indicato in rif.1, punto 5.5.1. (nessun evidente scostamento dalla linearità, nella generale dispersione dei dati )

### STIMA DELLA RETTA DI REGRESSIONE

#### **Considerazioni preliminari**

In linea di principio la stima della retta di conversione unica potrebbe essere condotta sulla base dei criteri esposti per ogni singolo laboratorio, a partire cioè da un unico set complessivo di dati e considerando la variabilità generale dei dati come omnicomprensiva dei possibili fattori che condizionano la relazione esistente tra le due variabili (di seguito indicata come modalità di regressione OLS) . Tuttavia, tenuto conto delle specifiche del metodo di riferimento ed in particolare dei parametri di precisione (riproducibilità) che lo caratterizzano (vedi rif. 5), è lecito attendersi da tale approccio un errore di stima residuo dalla regressione ( $S_{y:x}$ ) incrementato rispetto alle stime relative ai singoli Laboratori. Tale incremento potrebbe essere indotto, ad esempio, dalla dispersione fra laboratori nell'applicazione del metodo di riferimento. Per ridurre questo effetto ed ottenere quindi una stima del modello di regressione più rappresentativo della effettiva relazione, anche in considerazione della struttura gerarchica dei dati e della diversa numerosità di osservazioni prodotte dai vari laboratori, si ritiene più consono procedere sulla base delle seguenti premesse:

- i laboratori partecipanti al progetto vengono considerati come un campione della popolazione di laboratori sul territorio nazionale che potrebbero definire sperimentalmente una relazione fra IBC bactoscanFC e UFC, autoprodotta individualmente;
- il modello statistico che si intende adottare non è finalizzato ad evidenziare differenze statisticamente significative fra le singole unità sperimentali (laboratori) che hanno partecipato alla prova
- il modello è invece finalizzato essenzialmente a definire i parametri della relazione fra IBC bactoscan FC e UFC come stima “media” di quanto osservato nelle diverse unità sperimentali (laboratori) che hanno partecipato alla prova in quanto rappresentativi di differenti aree geografiche di origine dei campioni.

Come precedentemente accennato, sussiste in linea teorica una dispersione tra Laboratori elevata e non eliminabile, unicamente imputabile all'applicazione del metodo di riferimento, per caratteristiche proprie del metodo stesso. In rif. 5 per il metodo della semina in piastra viene riportato un parametro di ripetibilità  $r = 0,25 \log_{10}$ , ed un parametro di riproducibilità  $R = 0,45 \log_{10}$ . Sulla base delle indicazioni di rif.11, punto 5, è possibile isolare la componente di variabilità imputabile a differenze fra laboratori nell'applicazione del metodo, ricavandola dalla relazione

$$s_L = \sqrt{s_R^2 - s_r^2}$$

dove  $S_L$  rappresenta lo scarto tipo della teorica distribuzione normale di scarti delle medie di laboratorio intorno alla media generale osservata. La tabella seguente riporta la stima di tale parametro per il metodo in oggetto.

<b>parametro</b>	<b>valore UNI EN ISO 4833:2004</b>	<b>scarto tipo</b>
ripetibilità	0,25	0,088
riproducibilità	0,45	0,159
variabilità fra laboratori stimata		<b>0,132</b>

(tutti i valori sono in log10)

In pratica, sulla base delle specifiche di precisione riportate nel metodo di riferimento, si può affermare che, a titolo di esempio:

- n laboratori che applicano il metodo sullo stesso campione
- ottenendo una media generale (di tutti i laboratori) di 100000 UFC



- dovrebbero presentare una distribuzione normale degli scarti delle relative medie di laboratorio dalla media generale, con media 0 e scarto tipo  $0,132 \log_{10}$ .
- Questo significa che l'intervallo classico di 2s intorno alla media generale potrebbe comprendere valori di media di laboratorio variabili fra :

$$10^{(5 + 2 \times 0.132)} = \mathbf{184000 \text{ UFC}} \text{ e } 10^{(5 - 2 \times 0.132)} = \mathbf{54000 \text{ UFC}}$$

Sempre a titolo esemplificativo è quindi deducibile in questo modo l'entità delle possibili dispersioni attese nell'applicazione del metodo di riferimento *sullo stesso campione* da parte di diversi laboratori. Più in generale la dispersione fra laboratori può essere imputabile sia a componenti casuali che sistematiche, ma è indubitabile che gran parte di esse possa essere considerata presente su tutto il *range* di misura (le specifiche di precisione del metodo sono uniche per tutti i livelli) e quindi riflettersi, almeno in parte, in maniera analoga e sistematica su tutti i campioni analizzati con il metodo di riferimento da un determinato laboratorio.

### Elaborazione statistica: analisi preliminare dei dati

A partire dalle considerazioni teoriche di cui al punto precedente, si è quindi proceduto all'analisi dei dati, anche allo scopo di verificare la congruenza fra i presupposti e l'effettiva struttura dei dati. In via preliminare si è proceduto ad un'analisi grafica delle relazioni osservate all'interno dei singoli gruppi, per rilevare le tendenze comuni e le eventuali differenze sistematiche. Il grafico 2.8 presenta le rette di regressione stimate nei 15 laboratori, sovrapposte al diagramma di dispersione dei 1474 campioni disponibili. Il grafico è incentrato su un intervallo ristretto di valori IBC (10-1000) rispetto alla base dati complessiva, al fine di permettere una miglior visualizzazione dell'entità della dispersione fra rette di laboratorio. E' possibile apprezzare le differenze sistematiche (intercetta) e/o proporzionali (pendenza) fra le rette dei singoli laboratori. Nel medesimo Grafico è valutabile la retta OLS, stimata dall'insieme dei dati, considerati come un'unica popolazione (ignorando cioè la struttura gerarchica per laboratori). L'analisi grafica dei residui di tale regressione (grafico 2.9), raggruppati per laboratorio, evidenzia il sistematico scostamento in funzione del gruppo di appartenenza delle osservazioni, ad indicare (come atteso) un effetto "laboratorio" che è opportuno non trascurare in sede di elaborazione. Allo scopo di valutare la natura della dispersione fra laboratori, si è proceduto al confronto dei coefficienti delle rette di regressione dei singoli laboratori, con i relativi intervalli fiduciali. Tale valutazione è rappresentata nel grafico 2.10. Preliminarmente all'elaborazione si è proceduto a "centrare" le osservazioni sul valore medio di IBC, per eliminare la correlazione presente fra coefficiente angolare ed intercetta delle varie rette. Si nota che i 15 coefficienti angolari rappresentano una popolazione omogenea, con eccezione dei lab. 1, 6 e 9, mentre i valori di intercetta sono dispersi in modo sostanzialmente casuale, con diversi gruppi sovrapponibili. In base a ciò è quindi confermabile l'esistenza di un effetto fisso comune (la relazione fra UFC e IBC rappresentata dai coefficienti angolari delle rette) e un effetto casuale di dispersione fra laboratori (rappresentato dai valori di intercetta dei diversi laboratori).

### Stima della retta di regressione comune

Sulla base delle precedenti considerazioni si è quindi ritenuta idonea l'adozione di un **modello lineare ad effetti misti** quale strumento statistico per la definizione della retta di conversione. In tale modello :

- La relazione fra IBC bactoscanFC e UFC costituisce l'effetto fisso da indagare (stima dei parametri della retta di regressione comune)
- I diversi laboratori (gruppi) costituiscono un campione delle possibili n unità sperimentali in grado di stimare la relazione, rappresentando quindi una componente casuale di variabilità (effetto random).

Il modello lineare a effetti misti può essere in generale descritto dalla seguente relazione

$$y_i = X_i \beta + Z_i b_i + \varepsilon_i$$

dove:

$y_i$  è il vettore della variabile risposta delle osservazioni nel gruppo i-esimo;

$X_i$  è la matrice dei regressori degli effetti fissi per le osservazioni del gruppo i-esimo;

$\beta$  è il vettore dei coefficienti degli effetti fissi, **essi risultano identici per tutti i gruppi**;



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**  
**“BRUNO UBERTINI”**  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
**CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE QUALITA' LATTE BOVINO  
BRESCIA**

Via Bianchi, 9  
25124 BRESCIA  
Tel. 030-22901  
Fax: 030-2425251

$Z_i$  è la matrice dei regressori degli effetti casuali per le osservazioni del gruppo  $i$ .esimo; nello specifico caso vale 1 per tutti gli  $i$ .esimi gruppi.

$b_i$  è il vettore per i coefficienti degli effetti casuali per il gruppo  $i$ .esimo, **tali coefficienti variano a seconda del gruppo**; sono attesi con distribuzione normale e media 0.

$\varepsilon_i$  è il vettore dei termini di errore per le osservazioni del gruppo  $i$ .esimo; è atteso con media 0 e **varianza definita da  $\sigma^2$**

i parametri di interesse ricavabili dal modello, al fine della definizione della retta comune, sono essenzialmente costituiti da:

- $\beta$ , i coefficienti di regressione dell'effetto fisso comune a tutti i gruppi, cioè i parametri della retta di regressione comune
- $\sigma^2$ , la varianza d'errore associata alla retta comune stimata.

Una prima analisi grafica dei residui di regressione è riportata in grafico 2.11

Come già nella Parte 1 del presente documento, si è proceduto ad una selezione dei dati in funzione dei residui rispetto alla stima derivante dal modello di regressione, eliminando i campioni che presentavano uno scarto standardizzato  $> |2,58|$ . Il processo è stato eseguito iterativamente, producendo i risultati riportati nella tabella seguente:

ciclo eliminazione	n° dati residui	Sy:x	intercetta	pendenza	max Scarto std.	min Scarto std
0	1474	0,3421797	2,637396	0,8926647	4,626751	-3,768777
1	1443	0,3017323	2,615375	0,9040515	2,883140	-3,011508
2	1421	0,2855715	2,603354	0,9109134	2,684063	-2,799661
<b>3</b>	<b>1411</b>	<b>0,2792182</b>	<b>2,599427</b>	<b>0,9112202</b>	<b>2,605585</b>	<b>-2,551462</b>
4	1410	0,2786295	2,599174	0,9110993	2,606673	-2,556793
5	1408	0,2774409	2,597663	0,9112549	2,616843	-2,567138
6	1406	0,2762818	2,597109	0,9110554	2,615877	-2,578011
7	1405	0,2756901	2,597648	0,9106059	2,553434	-2,58383
8	1404	0,2751334	2,59878	0,910365	2,550452	-2,582527
9	1403	0,2745643	2,596166	0,9115391	2,559644	-2,553624
10	1403	0,2745643	2,596166	0,9115391	2,559644	-2,553624

Come si può osservare, dopo il terzo ciclo di selezione sia i parametri della retta comune che l'errore residuo di stima tendono a stabilizzarsi, rendendo sostanzialmente ininfluenti gli ulteriori passaggi, anche per lo scarso numero di osservazioni in essi implicate. Complessivamente il processo di screening così operato ha portato all'eliminazione di 63 osservazioni.

Nel grafico 2.11 i punti che giacciono al di fuori dei limiti di  $\pm 2.58$  sono stati esclusi dall'elaborazione successiva. Sono anche evidenziati gli outliers eliminati nel corso delle singole elaborazioni di laboratorio. E' così possibile apprezzare che molti dei punti esclusi dalle due elaborazioni (singole rette- retta comune) sono coincidenti.

Il risultato finale dell'elaborazione è riassunto nel prospetto di **tabella 7** che è strutturata in analogia a quella della retta del singolo laboratorio (tab. 4), limitatamente ai parametri stimati. Sono riportati i coefficienti della retta di regressione e i relativi limiti fiduciali. La parte inferiore della tabella riporta l'equazione della retta di regressione comune.

Come eseguito nella prima Parte per le stime per singoli Laboratori ( Tabella 5), si riporta anche la relazione derivante dall'applicazione della retta comune in forma direttamente adattabile al software strumentale (**Tabella 8**). Sono indicati i valori di conversione in UFC/mL per gli estremi del campo di misura IBC/ $\mu$ L e per il minimo e massimo valore di IBC/ $\mu$ L dei dati utilizzati per la stima.

A questo proposito riteniamo utile ricordare che l'applicazione della retta può essere correttamente ottenuta con l'utilizzo, nel software strumentale, di due sole coppie di valori ( corrispondenti ai limiti minimo e massimo di applicazione) . Non essendo possibile inserire direttamente nel software la retta di conversione logaritmica; essa viene stimata dal software sulla base di coppie successive di valori tabulati in scala lineare: l'effettiva conversione applicata è quindi funzione dei valori effettivamente inseriti nella tabella di conversione utilizzata dal software. Come già accennato nella Parte 1 per il



singolo Laboratorio, anche in questo caso va tenuto conto delle modalità di calcolo utilizzate dal software strumentale quando dovesse rendersi necessario definire ulteriori classi (coppie di valori) per gestire, ad esempio, i valori fuori dal normale campo di applicazione oppure per valori predefiniti che indichino situazioni specifiche in funzione delle procedure adottate dai singoli Laboratori (valori inferiori ai limiti previsti per i Blank, valori limite predefiniti etc.etc.).

L'adeguatezza del modello è stata verificata mediante analisi dei residui di regressione per il solo effetto fisso (retta comune stimata dal modello, dopo eliminazione delle 63 osservazioni sopra citate); la sostanziale normalità della distribuzione (deducibile dal grafico 2.12) conferma il buon adattamento del modello alle osservazioni.

Anche in funzione del confronto che ciascun Laboratorio è interessato a fare tra il risultato ottenuto sui dati autoprodotti e l'elaborazione complessiva, si ritiene utile una valutazione dei coefficienti  $b_i$  (effetto casuale) stimati dal modello per ciascun gruppo (laboratorio). La tabella 9 riassume tali valori. Come atteso dal modello, i coefficienti mediano a 0, con Dev. Standard 0,17. Questi valori rappresentano, per ciascun laboratorio, lo scarto fra media delle UFC stimate dalla retta comune e media delle UFC di riferimento del laboratorio, cioè lo scostamento medio (in termini logaritmici) della retta di laboratorio dalla retta comune.

La deviazione standard di tali valori è comparabile con la componente di riproducibilità del metodo di riferimento imputabile alla dispersione fra laboratori, precedentemente riportata: almeno una parte della variabilità osservata fra laboratori (Dev. Standard dei coeff.  $b_i$ ) potrebbe essere dovuta alle componenti di differenza sistematica insite nell'applicazione del metodo di riferimento a livello di singolo laboratorio, già richiamate in precedenza. La rappresentazione grafica dei coefficienti dell'effetto casuale è riportata in grafico 2.13, in termini di adeguamento alla normalità. Complessivamente l'attesa normalità della distribuzione dei coefficienti casuali appare rispettata.

Il secondo parametro di interesse stimato dal modello è l'errore entro gruppi o errore residuo, atteso con varianza costante nei gruppi e media 0. Il grafico 2.14 riporta l'andamento nei vari laboratori con il classico boxplot: si può notare che il valore medio per ciascun laboratorio giace approssimativamente sulla retta 0. L'entità della dispersione appare sostanzialmente sovrapponibile per molti gruppi. Anche in questo caso si possono considerare soddisfatte le premesse teoriche del modello.

Il grafico 2.15 rappresenta, infine, la retta comune stimata, che viene anche illustrata in confronto con quella derivante dai soli dati prodotti dal Laboratorio (grafico 2.16).

I coefficienti delle singole rette di laboratorio possono essere confrontati con quelli della retta comune derivante dal modello LME, in termini di intervalli fiduciali. I due grafici 2.17 e 2.18 rappresentano tale confronto, rispettivamente per coefficiente angolare ed intercetta. Come già osservato preliminarmente durante l'esplorazione dei dati, esistono alcuni laboratori le cui rette differiscono statisticamente dalla retta comune per uno o ambedue i parametri.

L'intervallo di confidenza della stima derivante dall'applicazione della retta comune, analogamente a quanto riportato in Parte 1 e considerando la numerosità delle osservazioni, può essere definito da:

$$CL (< y_{U/L} >) = a + b \cdot x \pm 1.96 \cdot S_{y:x}$$

## **CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE E PROSPETTIVE DI APPLICAZIONE**

Il lavoro svolto ha consentito di affrontare in modo uniforme un problema che ormai da decenni caratterizza la condizione operativa dei laboratori italiani in cui si esegue, per differenti finalità, la determinazione della carica batterica totale del latte con strumentazioni optofluorometriche.

A fronte di una situazione generalmente soddisfacente in termini di uniformità delle performances strumentali (conteggio in Impulsi), il livello di riproducibilità del metodo analitico risulta decisamente problematico proprio a causa delle differenti modalità di conversione finora adottate dai singoli Laboratori. Tale condizione è ulteriormente complicata dal fatto che una parte dei Laboratori ha di fatto adottato modalità di conversione prodotte e validate da altri (quindi su latte di diversa origine geografica) a volte introducendo anche modifiche parziali. Tale situazione risulta, del resto, confermata dagli esiti delle prove interlaboratorio periodicamente realizzate da A.I.A., in cui i valori di riproducibilità ottenuti dagli Impulsi sono costantemente, e notevolmente, migliori rispetto a quelli



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**  
**“BRUNO UBERTINI”**  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
**CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE QUALITA' LATTE BOVINO  
BRESCIA**

Via Bianchi, 9  
25124 BRESCIA  
Tel. 030-22901  
Fax: 030-2425251

ottenuti dai dati espressi in UFC.

Pur tenendo presente le limitazioni e i possibili punti critici conseguenti all'impostazione scelta per la realizzazione del presente progetto, riteniamo opportuno sottolineare l'importanza che può derivare dall'adozione su scala nazionale di un'unica ed uniforme modalità di conversione per tutto il settore analitico specializzato nel settore del latte crudo sia dal punto di vista tecnico e formale (documentazione di validazione della conversione) sia, soprattutto, da quello pratico (confrontabilità degli esiti forniti da laboratori diversi in diverse aree geografiche del paese) e legale (determinazioni su campioni con valenza di controllo ufficiale). I risultati ottenuti costituiscono del resto a nostro avviso un'ottima base di partenza anche per l'applicazione della conversione comune da parte di Laboratori diversi dal gruppo che ha partecipato al presente progetto. In ogni caso riteniamo che ciascun Laboratorio possa, e debba, considerare il risultato ottenuto in questo progetto quale elemento di confronto sia rispetto alla modalità di conversione adottata in precedenza (autoprodotta su latte locale o adottata da altri Laboratori), sia rispetto alle risultanze che, nel presente progetto, ha ottenuto come singolo Laboratorio (Parte 1). E' evidente infatti che, almeno in parte, l'adozione della conversione comune comporterà cambiamenti nell'espressione dei risultati rispetto al passato che, su base locale, andranno opportunamente gestiti, comunicati, considerati per le implicazioni che possono avere. Da questo punto di vista riteniamo utile sottolineare fin d'ora la disponibilità del Centro di Referenza a supportare sia dal punto di vista tecnico-scientifico che da quello più genericamente organizzativo ed informativo, i Laboratori che intendono adeguarsi alla conversione comune nel prossimo futuro.

In particolare questo supporto potrà essere richiesto per gli aspetti, già citati in precedenza, della trasposizione dei parametri della retta nel software strumentale quando si debbano definire classi specifiche di valori in funzione, ad esempio, di diversi limiti di linearità e/o campo di applicazione oppure per classi con limiti predefiniti sulle quali applicare specifici valori di riferimento previsti da procedure interne al singolo Laboratorio.

Così come è doveroso ricordare che, soprattutto nella prima fase di applicazione, sarà indispensabile continuare l'attività di collaborazione tra laboratori al fine di garantire il necessario monitoraggio degli effetti della nuova modalità operativa, di assicurarne gli ampliamenti e le verifiche periodiche (rivalidazione). Infine si può ipotizzare che il presente progetto fornirà, nel prossimo futuro, l'opportunità per una approfondita analisi di alcuni ulteriori elementi di studio degli aspetti scientifici della conversione ed in particolare degli effetti che determinate caratteristiche compositive del latte (numero cellule somatiche, contenuto in grasso e proteine, acidità, presenza di sostanze conservanti) possono avere sui conteggi strumentali e quindi, in conseguenza, sulla conversione dei dati.

#### **RINGRAZIAMENTI**

*Si ringraziano per la fattiva collaborazione i numerosissimi, e quindi non menzionabili singolarmente, Dirigenti e Tecnici di Laboratorio che nel corso di oltre un anno hanno partecipato alla progettazione del lavoro, la sua realizzazione sperimentale e, infine, alla produzione del presente dossier;*

*Si ringrazia il Laboratorio Standard Latte dell'A.I.A per l'adesione ed il supporto organizzativo offerto. Ringrazio infine in modo particolare, il Sig. Antonio Marcolini dell'I.Z.S.L.E.R, per l'insostituibile ed efficace supporto professionale offerto nell'elaborazione statistica dei dati.*

=====



## Riferimenti

1. ISO 21187:2004 Milk – Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results.
  2. conteggio dei batteri tramite Bactoscan FC – specifiche tecniche - come risultano aggiornate alla data del presente documento in:  
<http://www.foss.it/Solutions/ProductsDirect/BactoScanFC/TechnicalSpecifications.aspx>
  3. FIL-IDF 161A :1995 determination quantitative de la qualite bacteriologique – directive pour l’evaluation des methodes de routine
  4. Evaluation of the Bactoscan FC – Milch-wissenschaft 56(6) 318-321 (2001)
  5. UNI EN ISO 4833:2004 microbiologia di alimenti e mangimi per animali – metodo orizzontale per la conta di microrganismi – tecnica della conta delle colonie a 30°C
  6. FIL-IDF 169:1994 controle de qualite en laboratoire de microbiologie- evaluation des performances de l’analyste pour le denombrement des colonies
  7. ISO 7218 :1996/Amd.1 :2001 microbiology of food and animal feeding stuffs – general rules for microbiological examinations – amendement 1
  8. ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods
  9. ISO 8196-1:2000 Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis – part 1: analytical attributes of indirect methods
  10. ISO 5725-2:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results –part 2
  11. ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results –part 1
  12. Mixed-effects models in S and S-PLUS, J.Pinheiro, D. M. Bates, 2000, Springer ed.
- 
- 

**Il presente Documento è completato da :**

- n° 9 Tabelle , n° 22 Grafici in parte comuni ed in parte personalizzate sul singolo Laboratorio partecipante
  - n° 1 Allegato riportante i dati grezzi ottenuti nelle prove dal singolo Laboratorio.
- 
-



**Tabella 1: parametri di precisione attesi per il metodo di routine Bactoscan FC**

Livello	Ripetibilità (log10)		Riproducibilità (log10)	
	d.s.	RD <sub>95</sub>	d.s.	RD <sub>95</sub>
<10	0,150	1,7	0,300	6,1
<b>10-50</b>	<b>0,070</b>	<b>0,6</b>	<b>0,110</b>	<b>1,0</b>
<b>51-200</b>	<b>0,050</b>	<b>0,4</b>	<b>0,070</b>	<b>0,6</b>
<b>&gt;200-1000</b>	<b>0,040</b>	<b>0,3</b>	<b>0,060</b>	<b>0,5</b>
>1000	0,030	0,2	0,050	0,4

**Tabella 2: ripetibilità strumentale Bactoscan FC osservata nei dati del laboratorio n° X**

Omissis

**Tabella 3: statistiche descrittive dei dati di laboratorio**

Omissis

**Tabella 4: stima della retta di regressione lineare OLS per il singolo laboratorio n° X**

Omissis

**Tabella 5: tabella di conversione per il laboratorio n° X**

Omissis

**Tabella 6: statistiche descrittive dei dati iniziali per la stima della retta comune**

Statistiche dati per la retta comune	
n° dati validi	1474
Media di logIBC/μL	2,487558
Media di logUFC/mL	4,861786
scarto tipo di logIBC/μL	0,854431
scarto tipo di logUFC/mL	0,829906
Min di IBC/μL	6
Max di IBC/μL	48936
Min di UFC/mL	400
Max di UFC/mL	27000000



Tabella 7: stima della retta di regressione comune

STATISTICA DELLA REGRESSIONE PER IL MODELLO LME						
Errore standard	0,279					
Osservazioni	1410					
	Coefficienti	Errore standard	Stat t	Valore di significatività	Inferiore 95%	Superiore 95%
Intercetta	<b>2,599</b>	0,050	51,7	0	2,501	2,698
LogIBC	<b>0,911</b>	0,009	100,9	0	0,893	0,929

**$\text{Log}_{10}(\text{UFC}/\text{mL}) = \log_{10}(\text{IBC}/\mu\text{L}) \times 0,911 + 2,599$**

Tabella 8: tabella di conversione per retta comune

BC FC/ $\mu\text{L}$	U.F.C. stimate/mL
<b>5</b>	<b>1.721</b>
<b>6</b>	<b>2.032</b>
<b>48.936</b>	<b>7.434.496</b>
<b>50.000</b>	<b>7.581.614</b>

Tabella 9: coefficienti per effetto casuale relativi a ciascun laboratorio

laboratorio	coeff. $b_i$
1	-0,1395
2	-0,0471
3	-0,1031
4	0,3248
5	-0,2342
6	-0,0588
7	0,1120
8	-0,0212
9	0,2694
10	0,0014
11	0,1421
12	-0,2746
13	-0,1093
14	0,0643
15	0,0737
<b>Media</b>	<b>0,000</b>
<b>dev. Standard</b>	<b>0,17</b>





Grafico 1.1 - Omissis -

Grafico 1.2 - Omissis -

Grafico 1.3

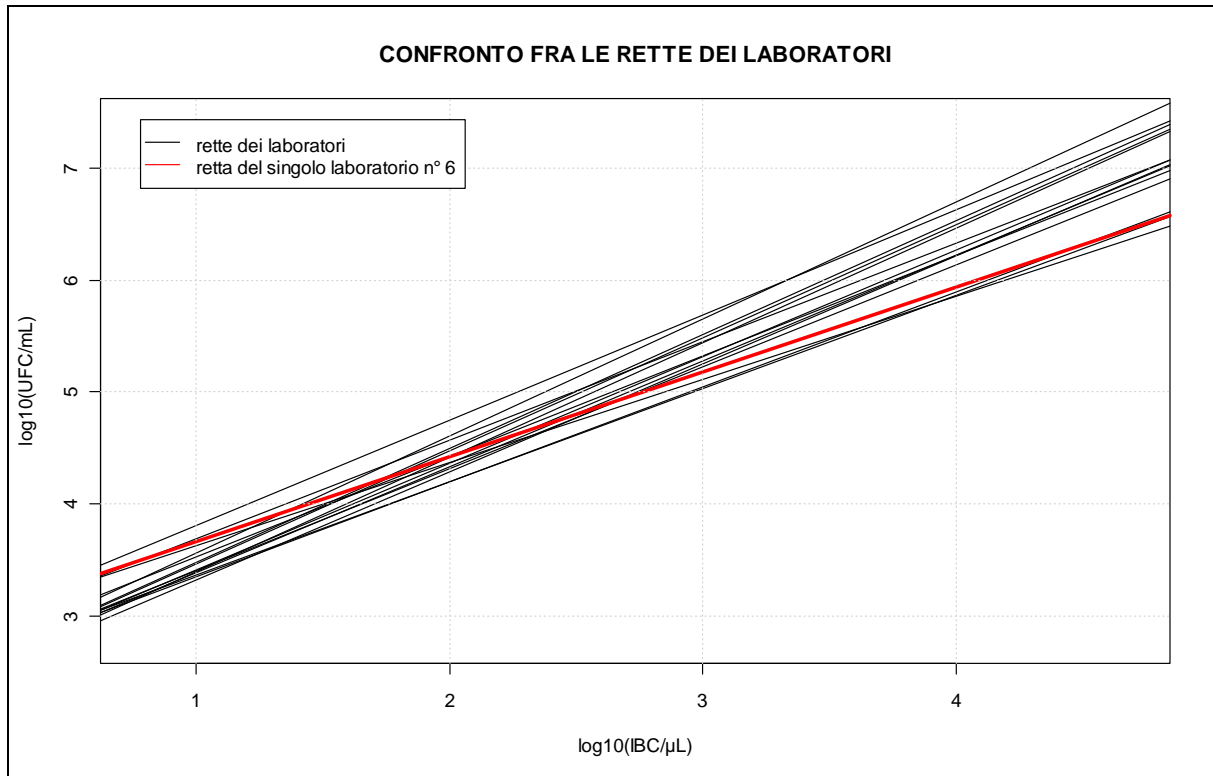




grafico1.4

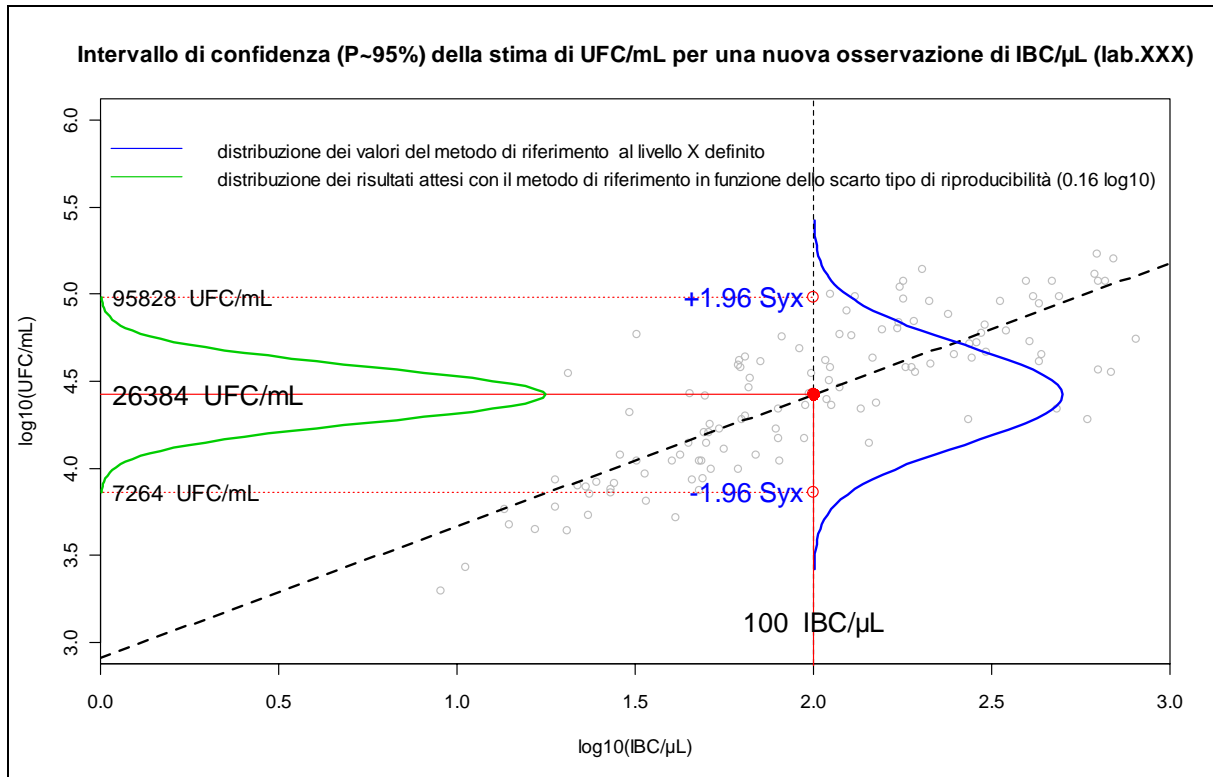




grafico 2.1

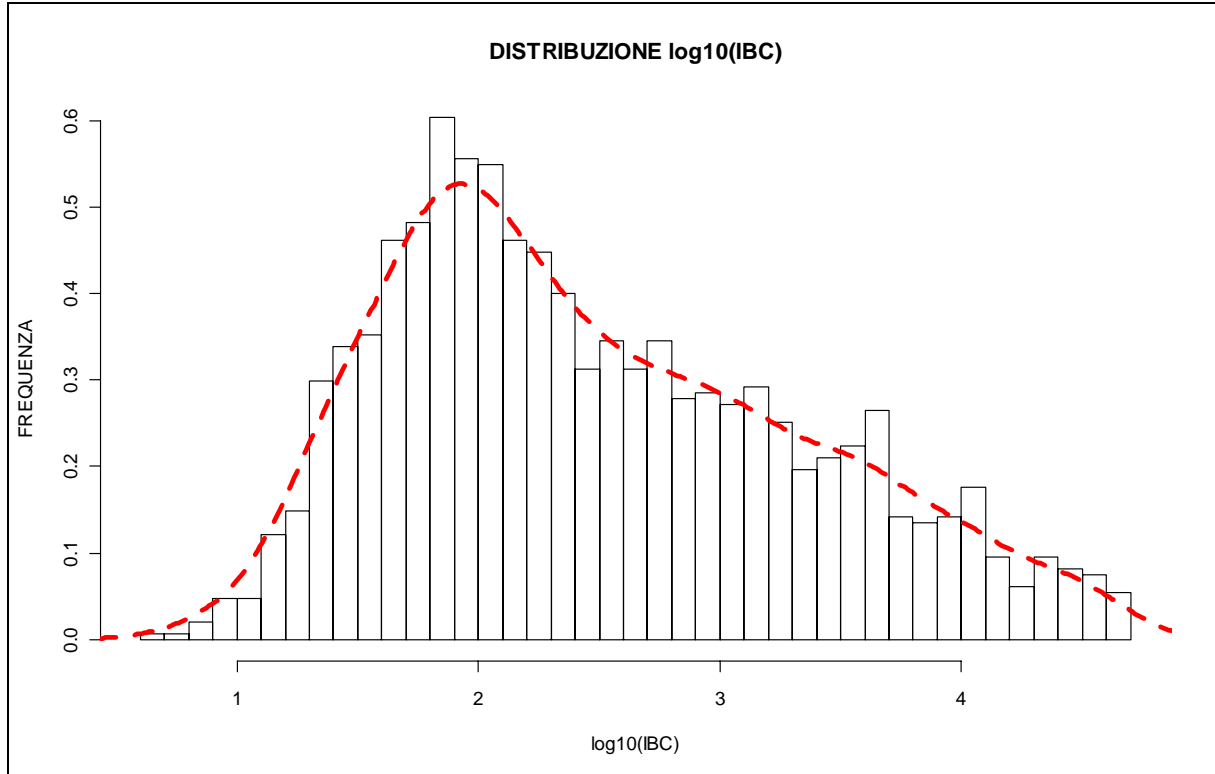
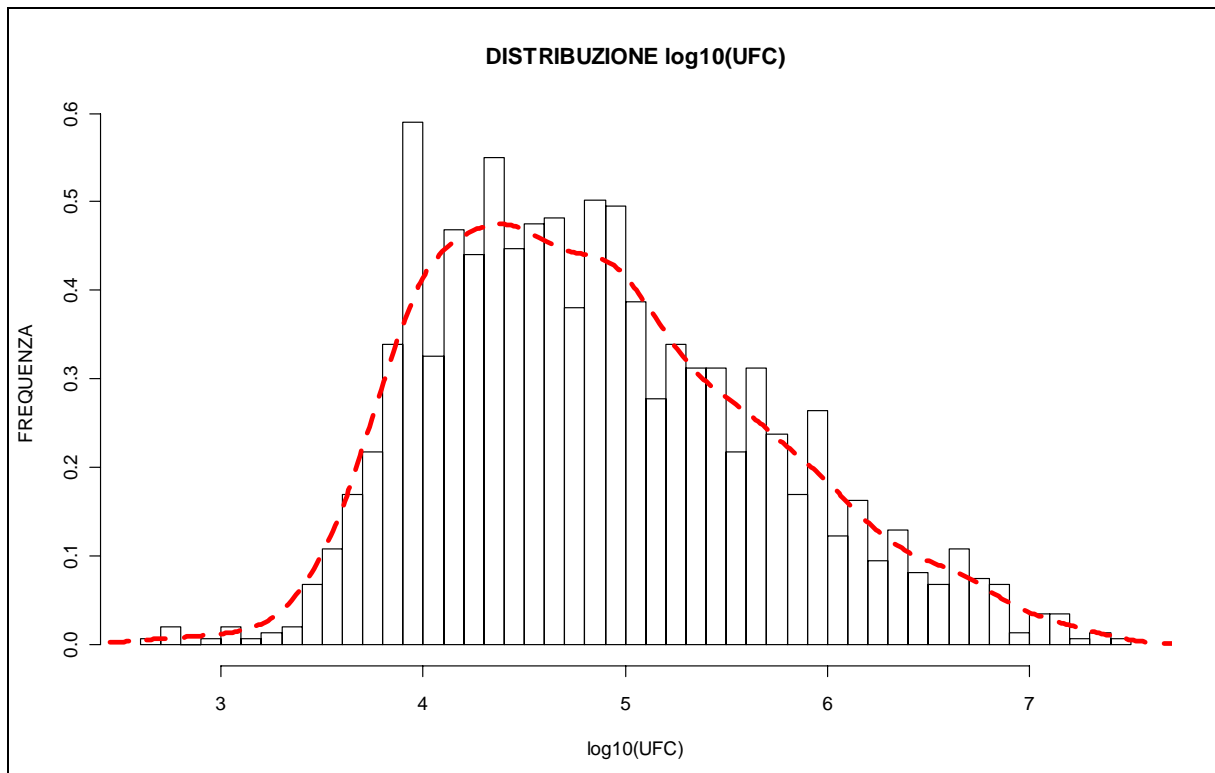


grafico 2.2





**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA  
"BRUNO UBERTINI"  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE QUALITA' LATTE BOVINO  
BRESCIA**

Via Bianchi, 9  
25124 BRESCIA  
Tel. 030-22901  
Fax: 030-2425251



grafico 2.3

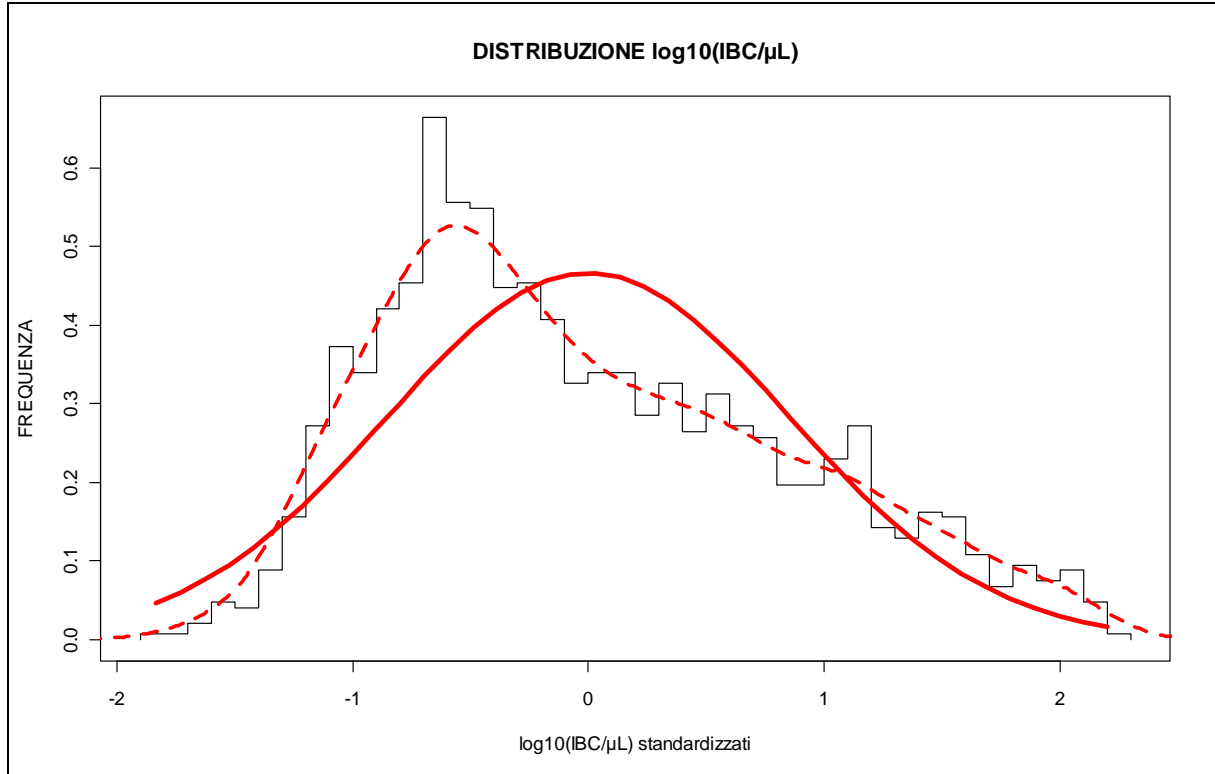
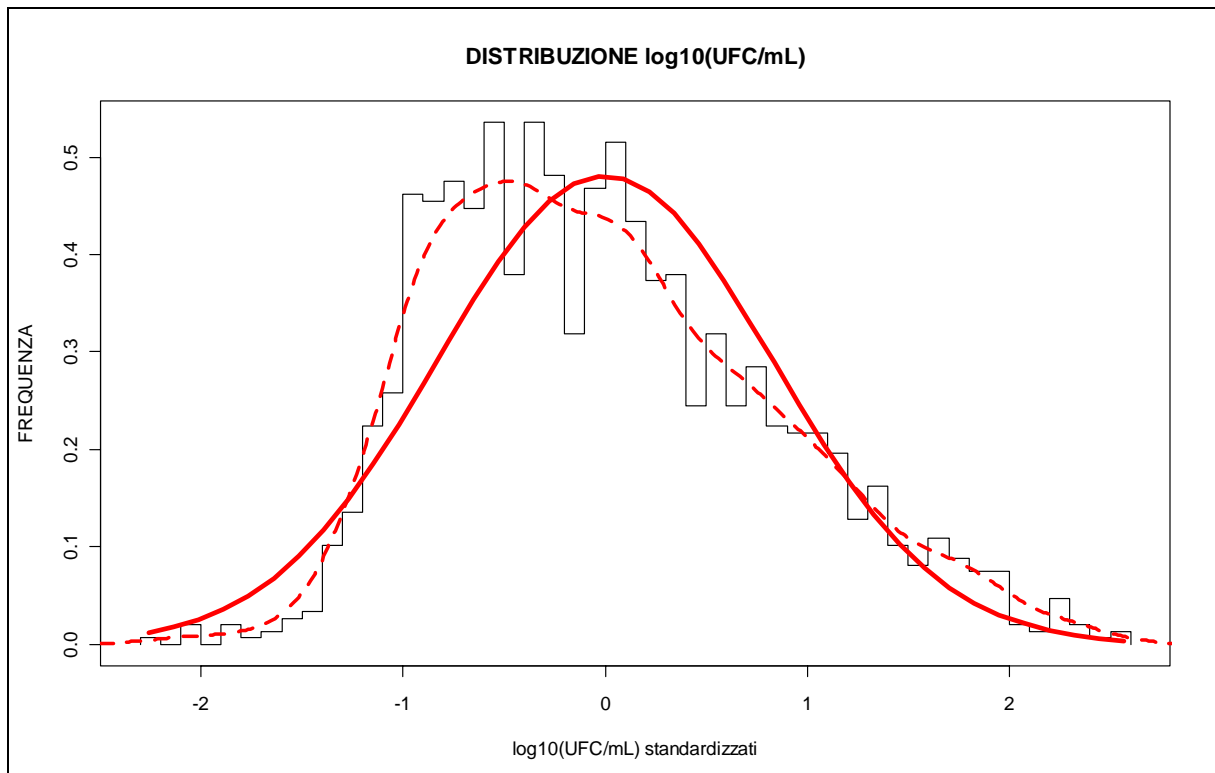


grafico 2.4





**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA  
"BRUNO UBERTINI"  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE QUALITA' LATTE BOVINO  
BRESCIA**

Via Bianchi, 9  
25124 BRESCIA  
Tel. 030-22901  
Fax: 030-2425251



grafico 2.5

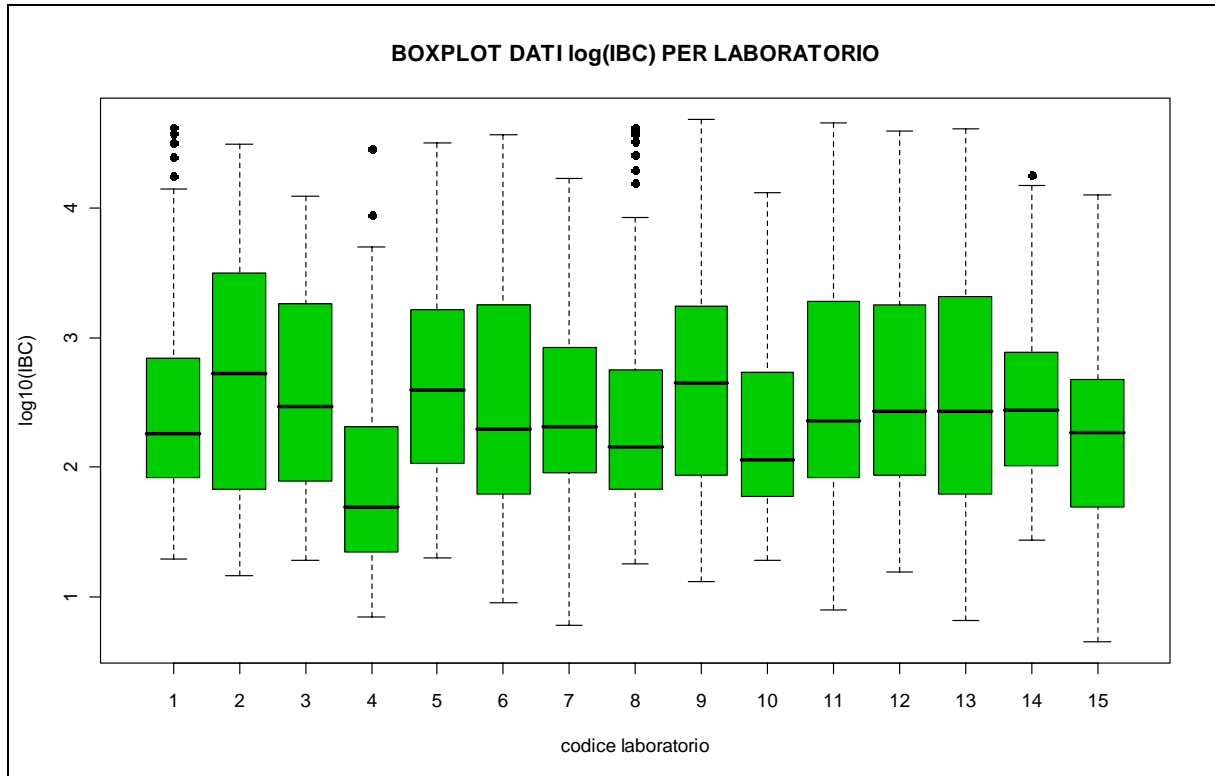
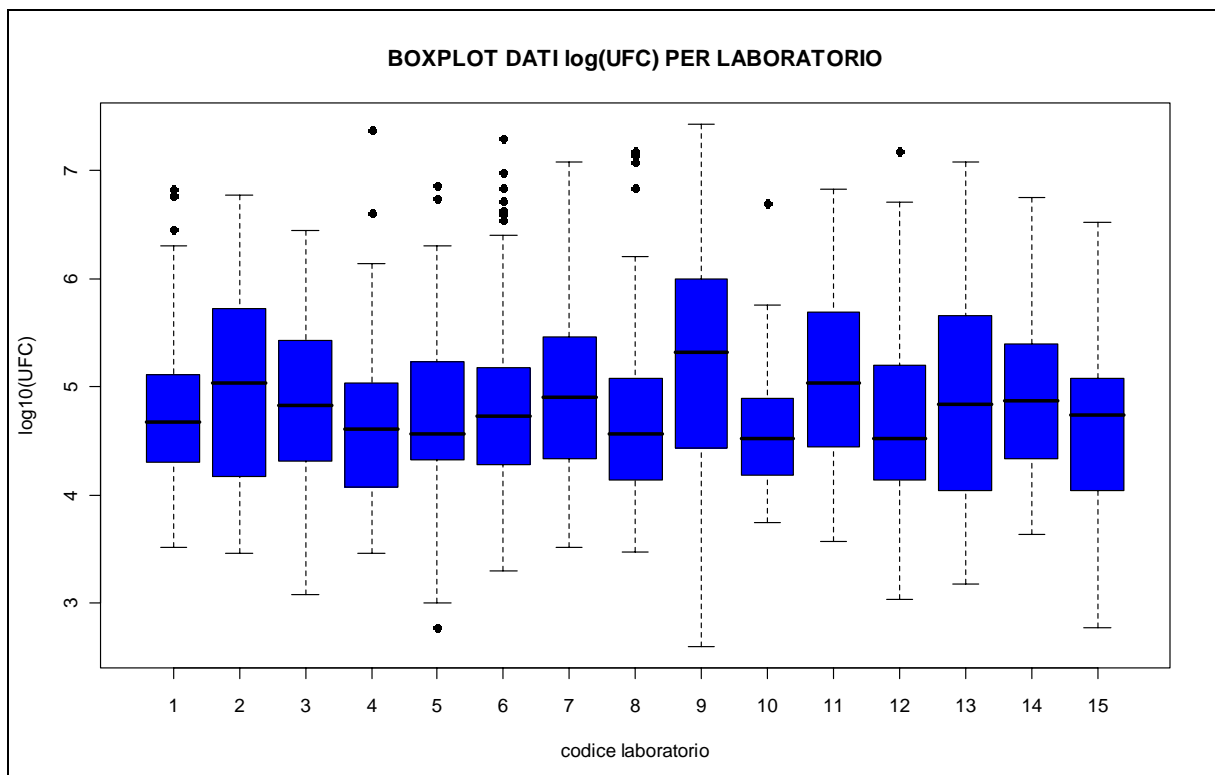


grafico 2.6





**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE  
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA  
"BRUNO UBERTINI"  
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)  
CENTRO DI REFERENZA NAZIONALE QUALITA' LATTE BOVINO  
BRESCIA**

Via Bianchi, 9  
25124 BRESCIA  
Tel. 030-22901  
Fax: 030-2425251





grafico 2.7

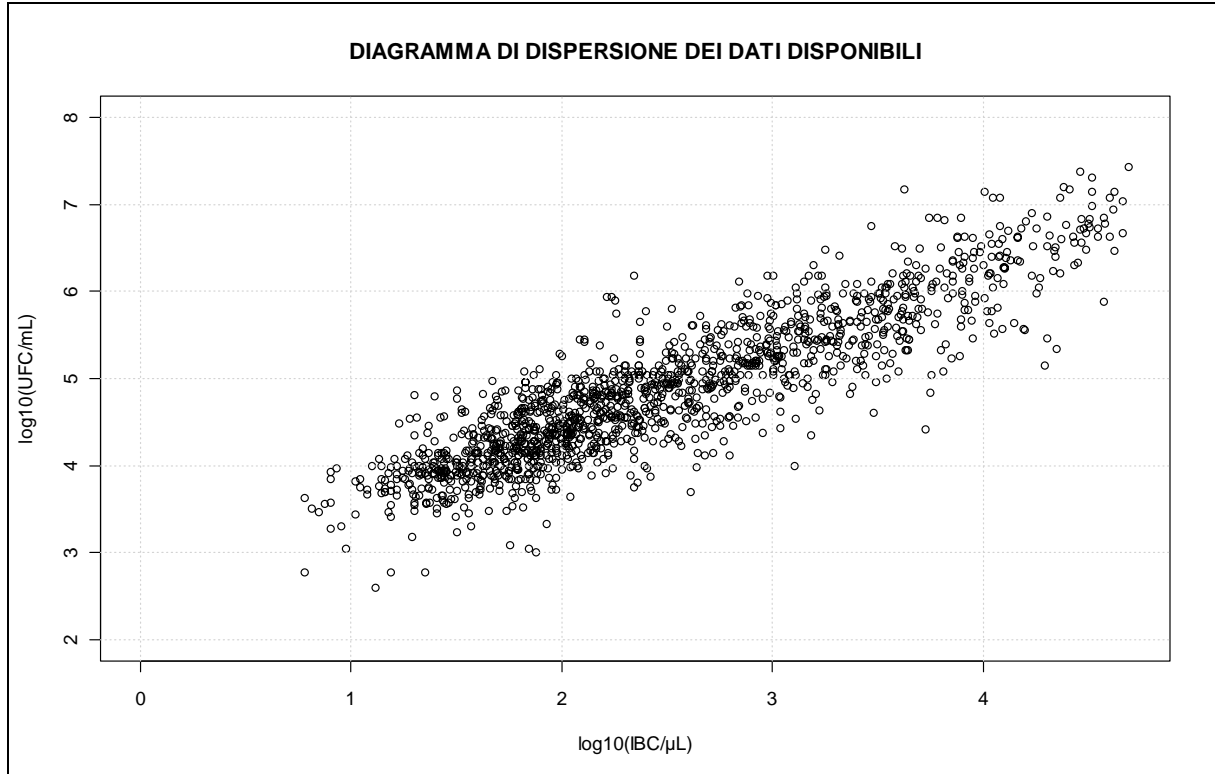


grafico 2.8

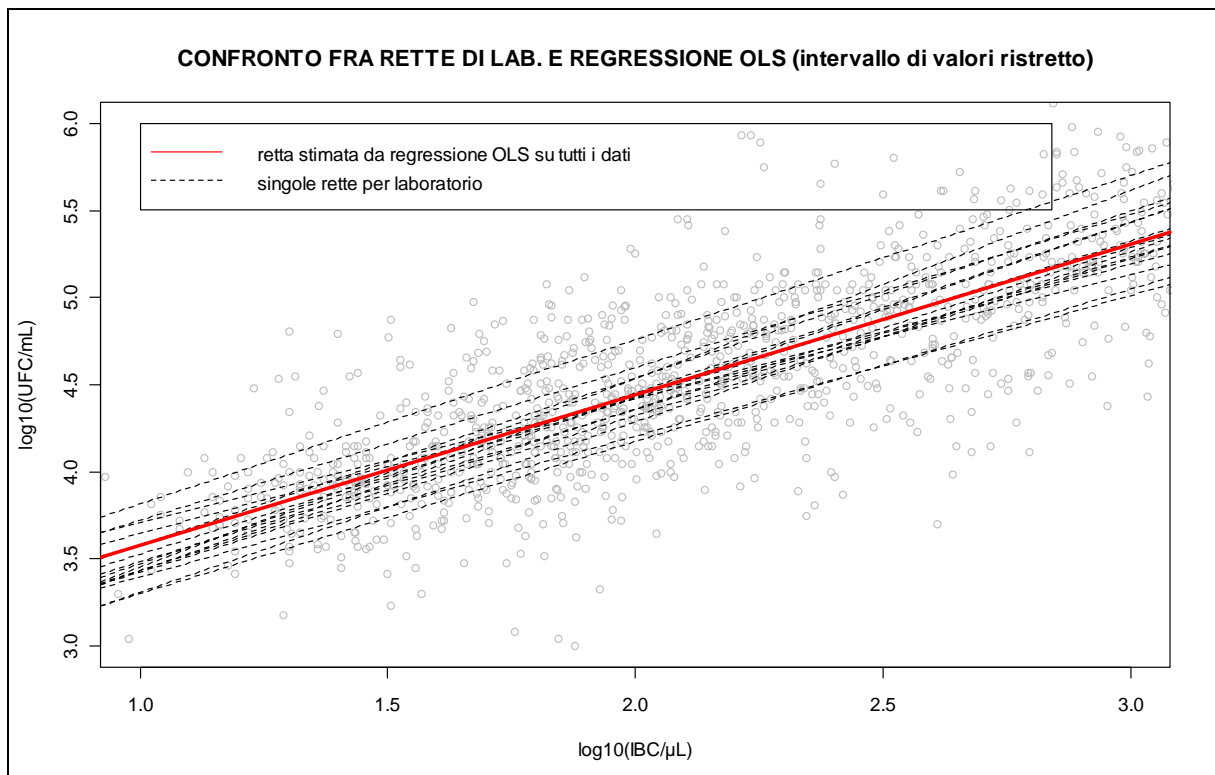




grafico 2.9

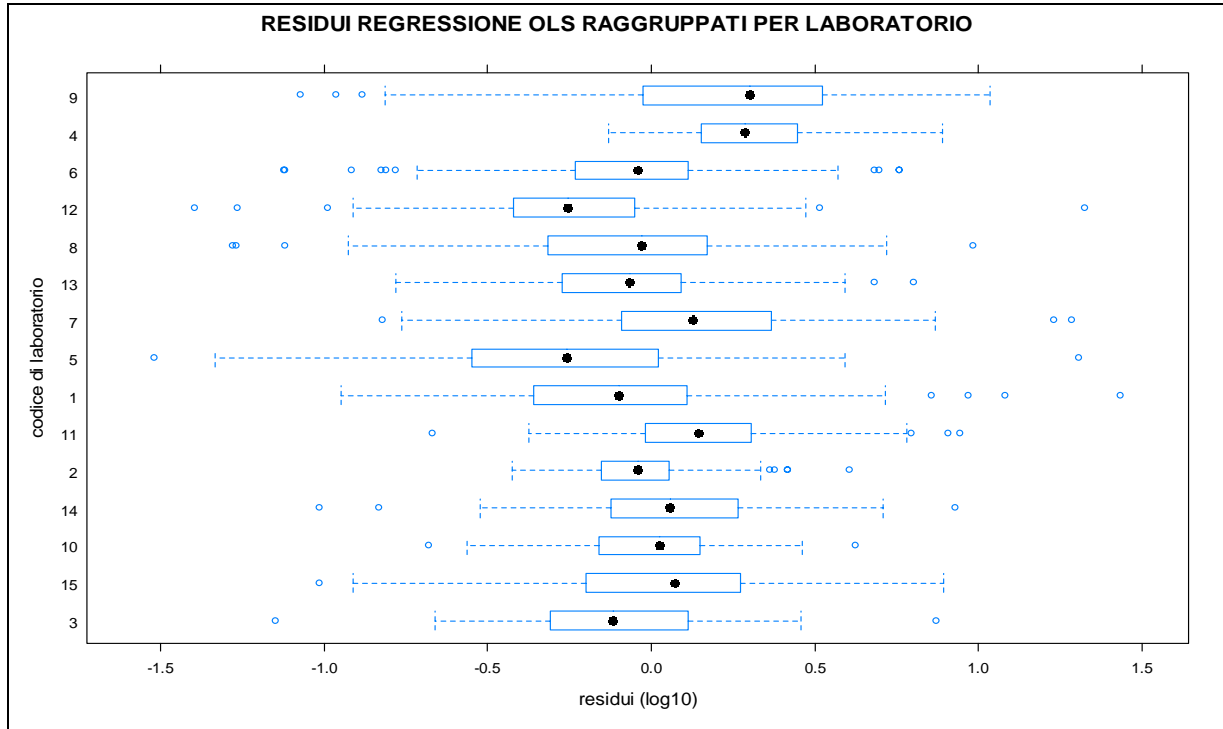


grafico 2.10

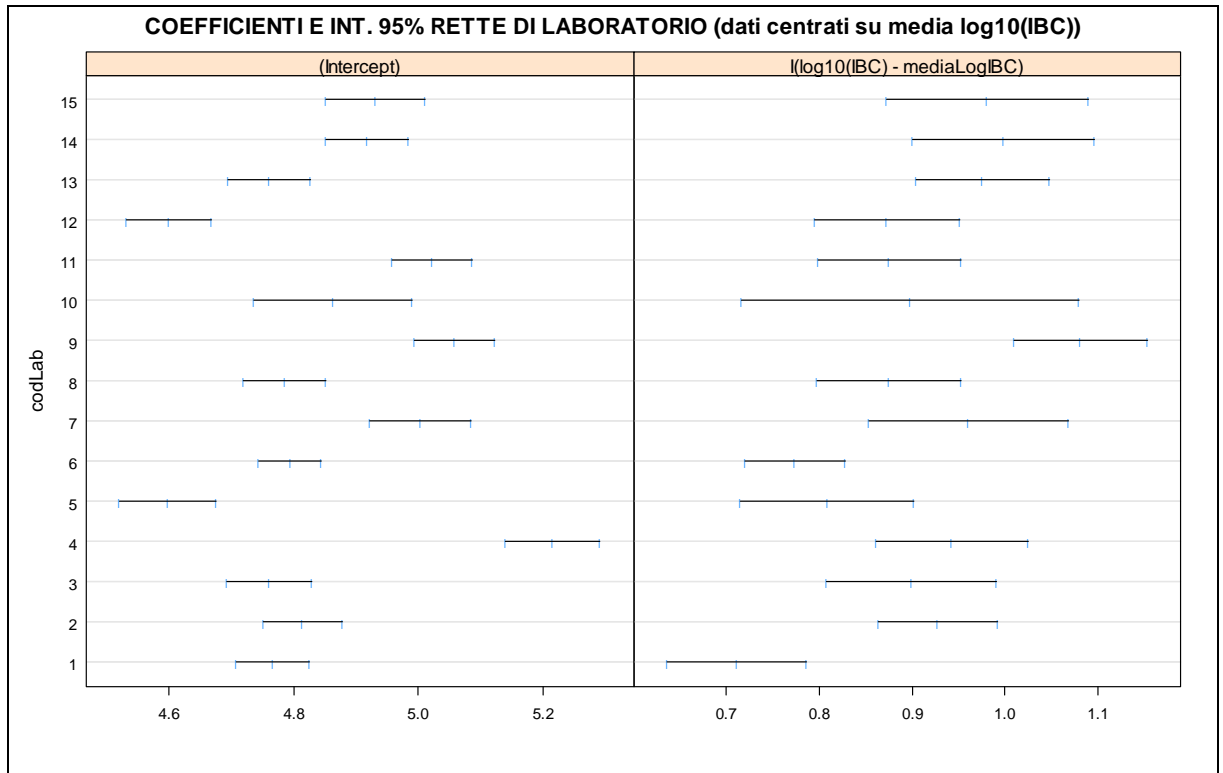




grafico 2.11

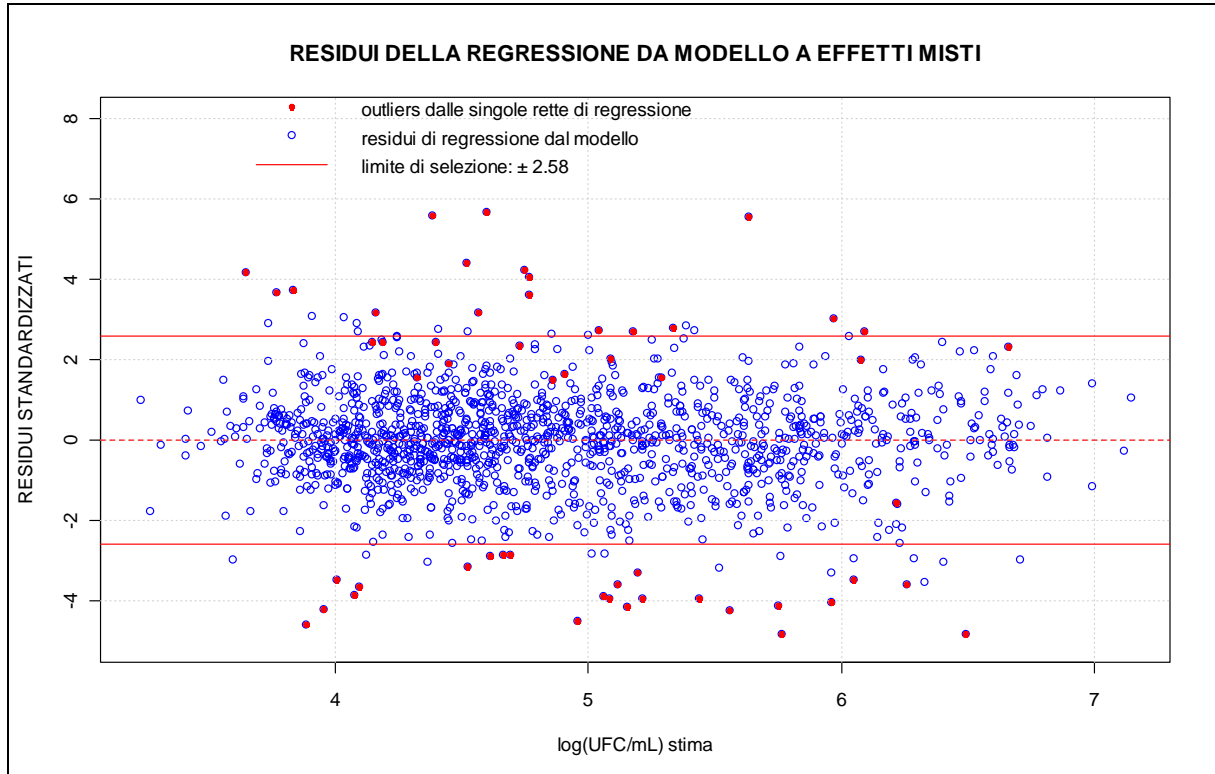


grafico 2.12

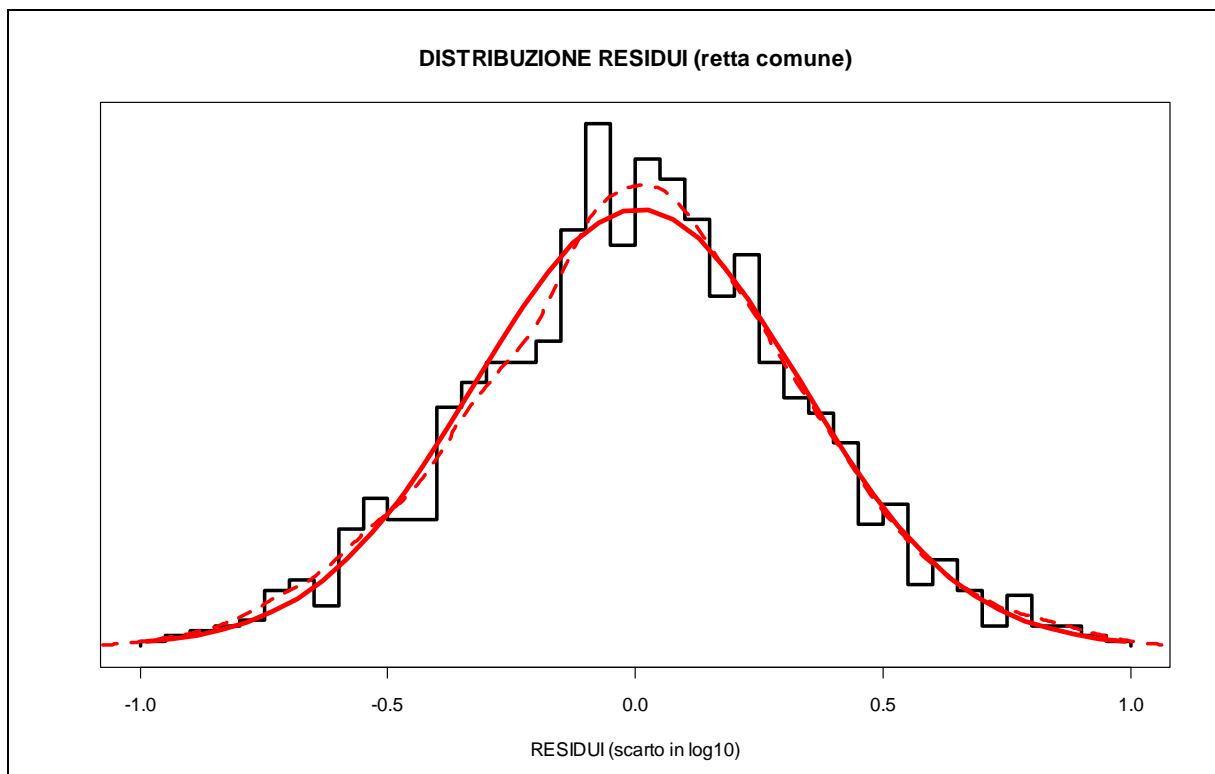




grafico 2.13

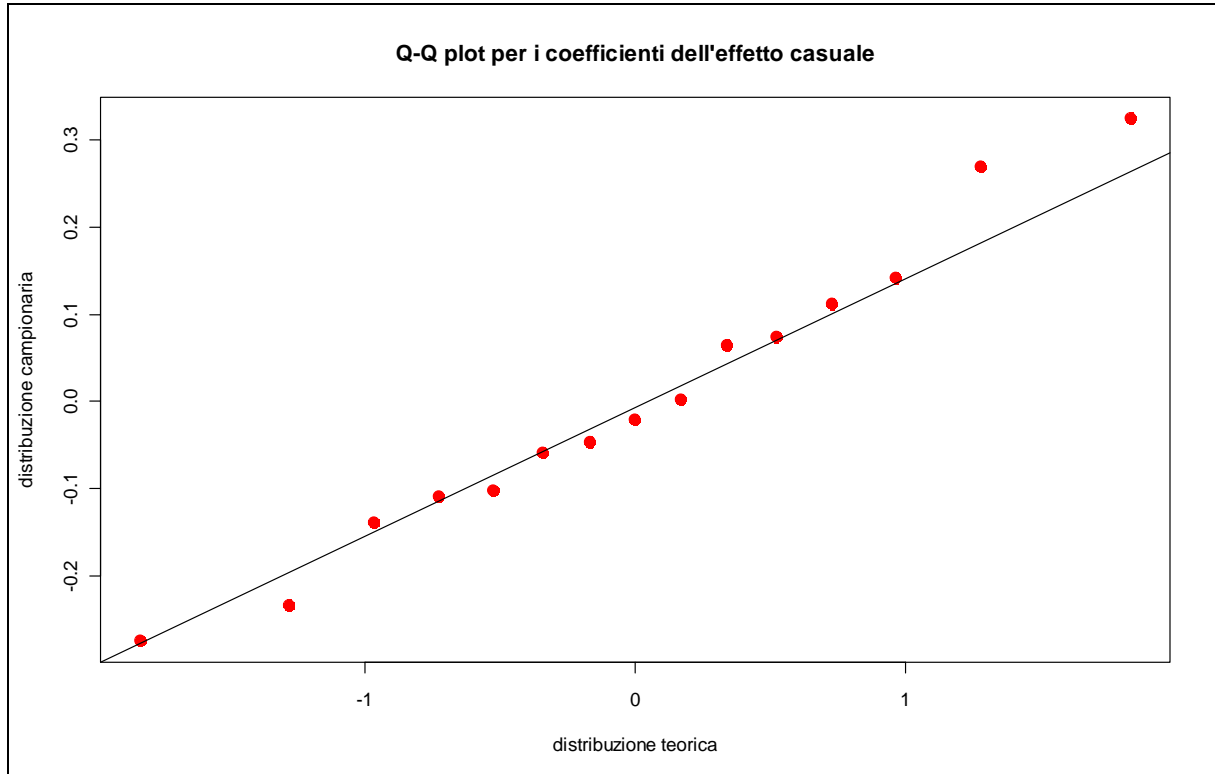


grafico 2.14

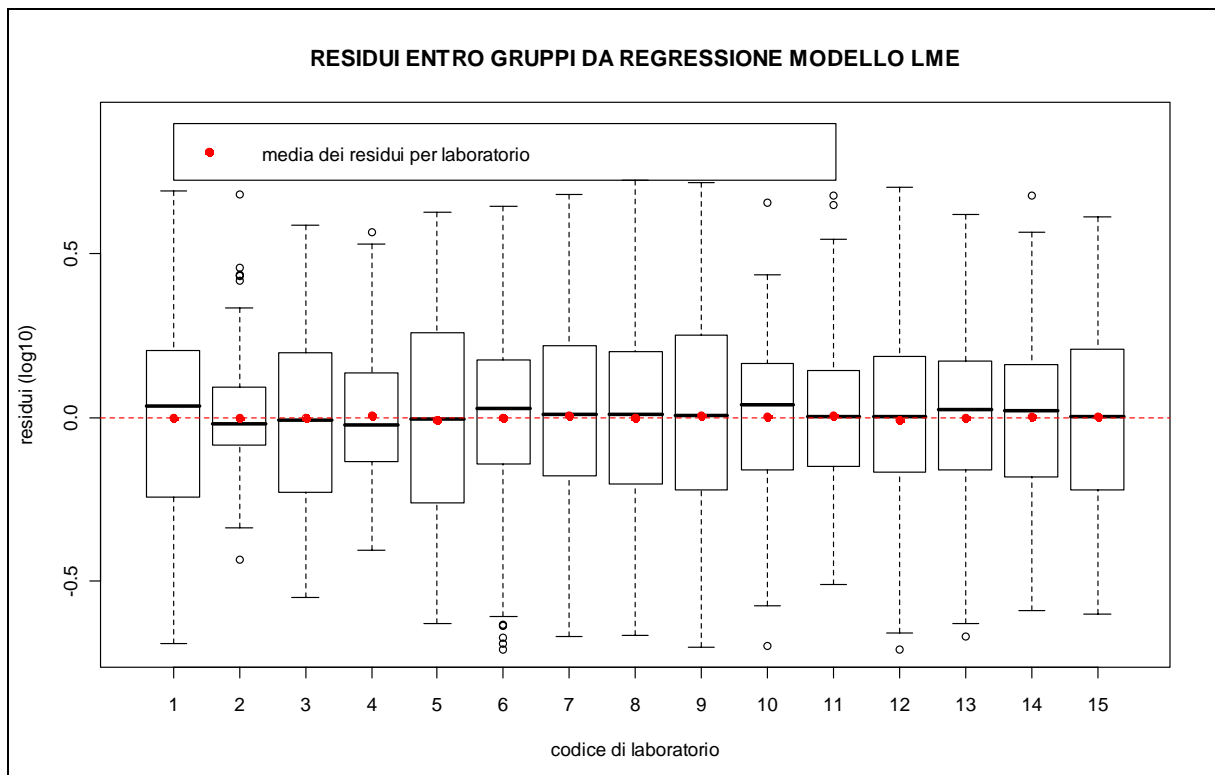




grafico 2.15

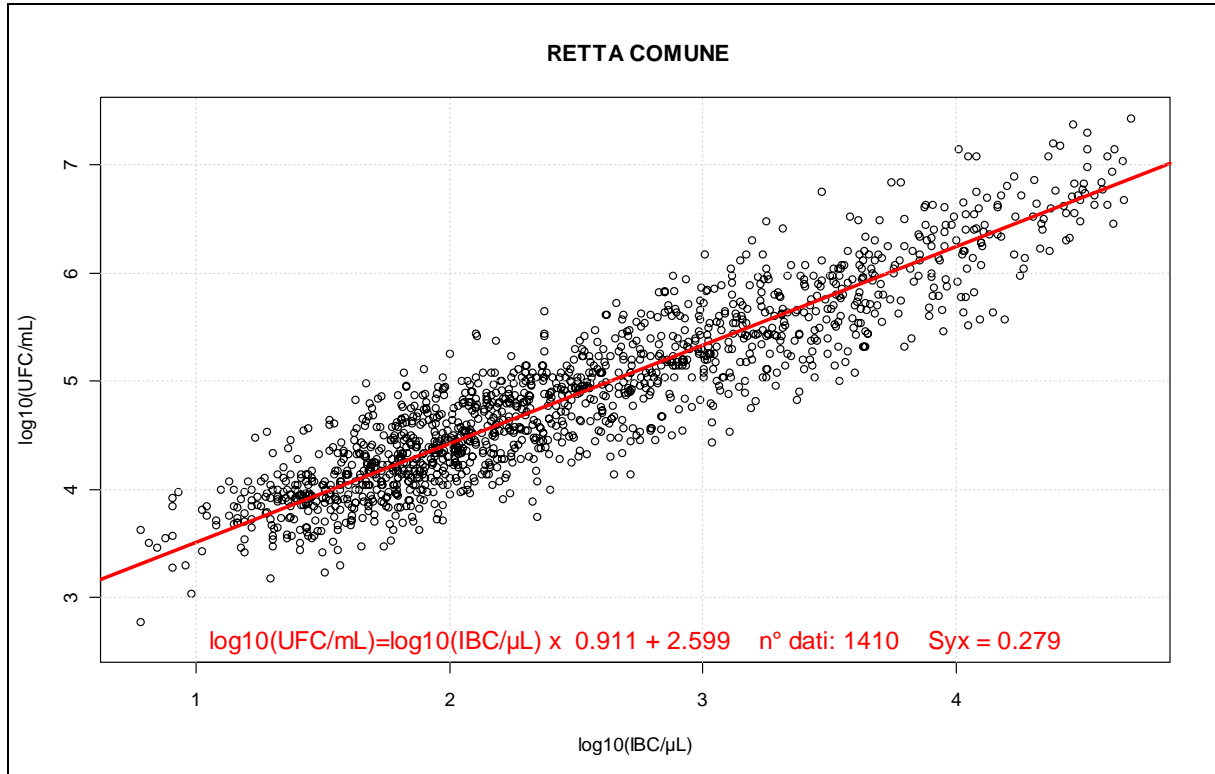


grafico 2.16 – Omissis -  
grafico 2.17

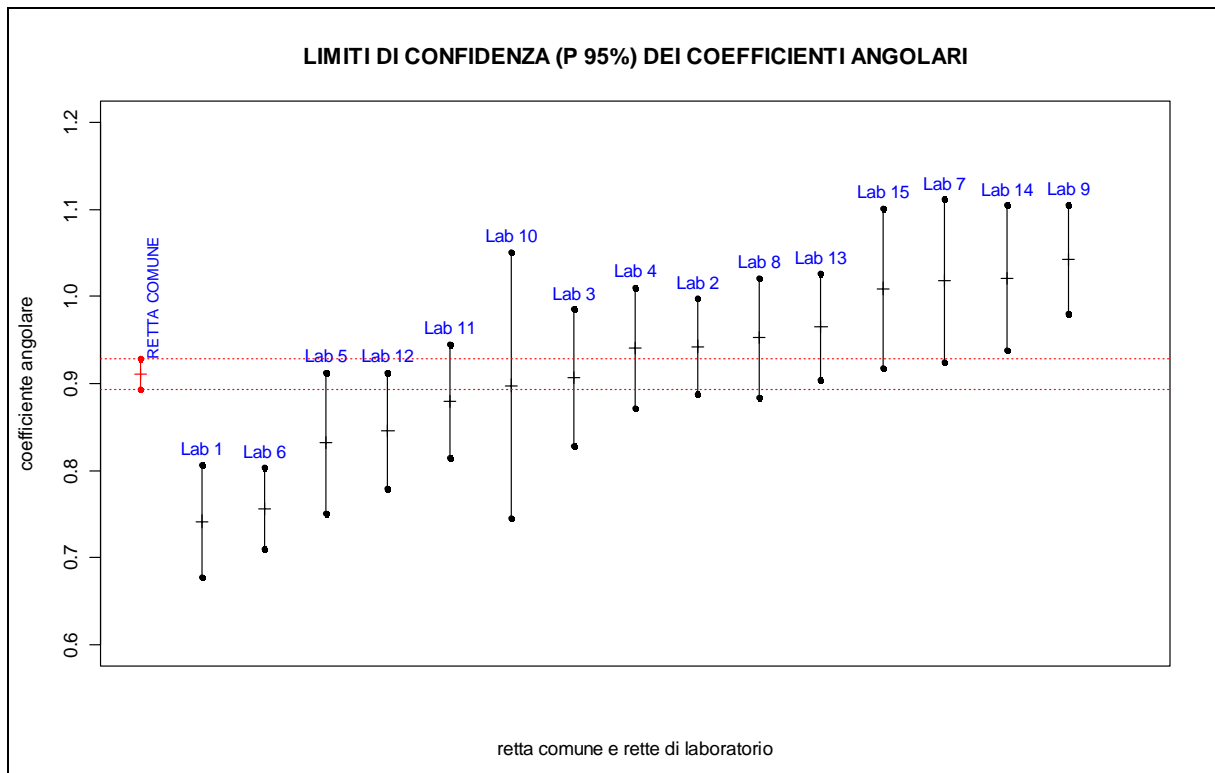
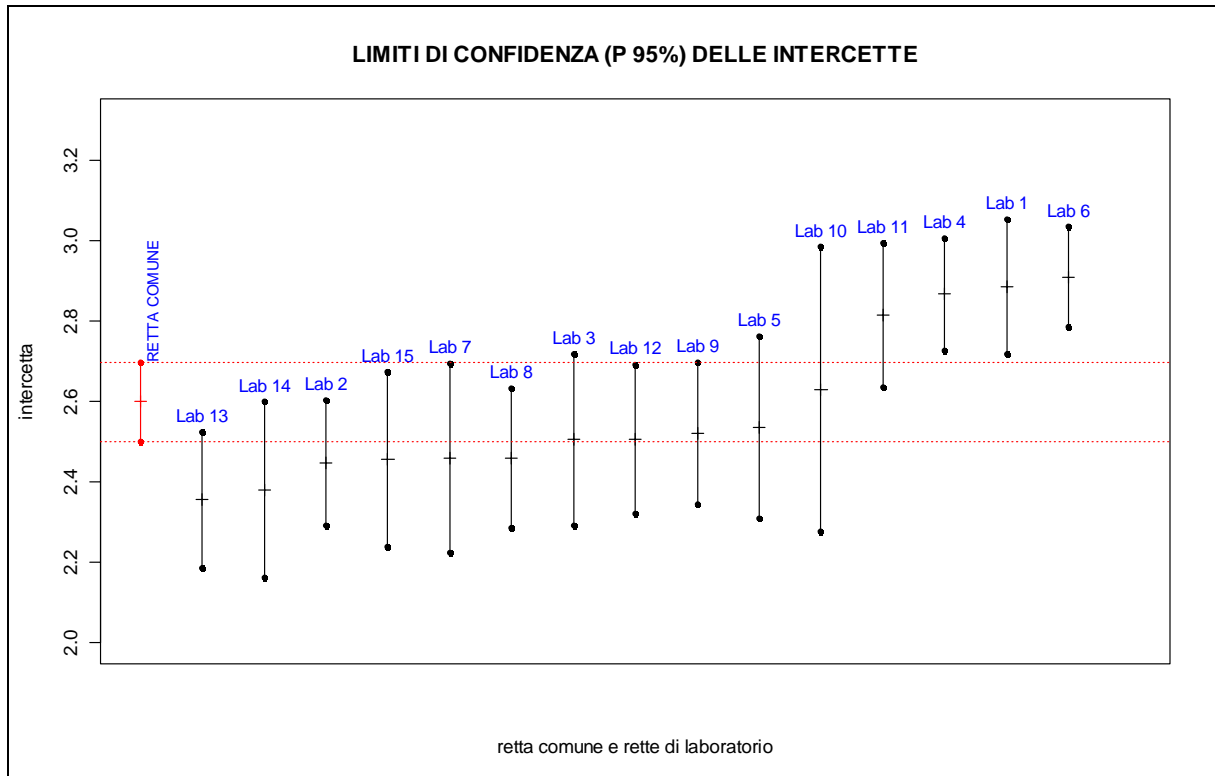




grafico 2.18



### Allegato 1: LABORATORIO X

Quadro analitico dei risultati e della gestione dei dati dei singoli campioni analizzati

- OMISSIS -