

PROGETTI DI RICERCA CORRENTE 2017
N. identificativo progetto 008/2017 RC

TITOLO PROGETTO : Creazione di una modalità unica nazionale per la conversione dei risultati di strumenti a cella di flusso per la determinazione della carica batterica del latte crudo di bufala

RELAZIONE FINALE - Unità Operativa Coordinatrice 01

RESPONSABILE SCIENTIFICO : Dr. Giuseppe Bolzoni

Area tematica : Sicurezza Alimentare

Responsabile Scientifico : Dr. Giuseppe Bolzoni

Tel: 0302290541 E-mail: giuseppe.bolzoni@izlser.it

U.O. Coordinatrice : n° 1 IZSLER

Data di Inizio : 31/12/2017

Data Scadenza : 28/06/2020 (Proroga Autorizzata) ; 28/12/2020 (Proroga Covid)

Data Stampa Relazione : 05/08/2020

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute, Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della Sicurezza alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute

SINTESI

Titolo del progetto: Creazione di una modalità unica nazionale per la conversione dei risultati di strumenti a cella di flusso per la determinazione della carica batterica del latte crudo di bufala

L'obiettivo primario della ricerca era la costruzione di una modalità di conversione per i risultati ottenuti con strumenti a cella di flusso per la determinazione della carica batterica nel latte di bufala, applicabile sull'intero territorio nazionale. Obiettivo secondario era quello di confrontare i risultati ottenuti con quelli già prodotti negli anni scorsi relativamente alla matrice latte bovino, così da definire se sia indispensabile o meno applicare differenti modalità di conversione alle due matrici nel corso delle attività analitiche quotidiane.

Il problema della conversione dei risultati del metodo alternativo per la determinazione della carica batterica nel latte crudo in equivalenti Unità Formanti Colonia, si è posto fin dagli anni '80 con la comparsa del primo strumento automatico (Bactoscan 8000 a disco rotante, Foss). Affrontato a livello internazionale in modo differente e senza una vera ed uniforme soluzione, il problema si è protratto fino agli anni 2000 anche quando furono introdotti nuovi strumenti a cella di flusso (Bactoscan FC, Foss e Bactocount, Bentley). La limitata riproducibilità del metodo, dovuta al fatto che differenti laboratori applicavano diverse modalità di conversione, ha di fatto condizionato per più decenni la portata dei notevoli vantaggi che questo metodo alternativo forniva rispetto a quello di riferimento della semina in piastra (ISO 4833/2003): miglior ripetibilità, maggior rapidità di esito, economicità di esecuzione, stabilità nel tempo, maggior accuratezza e possibilità di analizzare campioni con conservante. Per questo motivo il CNR QLB, dopo esperienze condotte in proprio sia negli anni '90 che nei primi anni 2000 (Bolzoni G. et al., 2000, 2001), si è fatto promotore nel 2008 di un Progetto per la validazione di una modalità di conversione unica e volontaria con la partecipazione di 18 laboratori italiani (Bolzoni G., Marcolini A, 2010). In una seconda fase, insieme al I.S.S. di Roma come Laboratorio nazionale di Riferimento, il progetto è stato ampliato con il coinvolgimento di 30 laboratori su tutto il territorio nazionale e la validazione nel 2010 della Conversione Nazionale, adottata da allora dalla maggioranza dei laboratori del nostro Paese (Bolzoni G. et al., 2015). Questa esperienza ha sicuramente determinato un significativo miglioramento della uniformità degli esiti analitici a livello nazionale ed è stata considerata e valorizzata anche a livello internazionale con iniziative simili o derivate. Più di recente un lavoro simile è stato coordinato dal CNR del IZS Lazio e Toscana per quanto riguarda il latte ovi-caprino. Da questo percorso scaturisce quindi la specifica richiesta del CNR per il Bufalo di Salerno (IZSME) che si è concretizzata nel presente Progetto. Considerata la scarsa rilevanza di questo settore produttivo nei paesi occidentali, mancano infatti esperienze specifiche realizzate e documentate a livello internazionale. Anche in Italia del resto l'allevamento del bufalo e la relativa produzione casearia riveste importanza strategica soltanto nella zona tradizionale (Lazio e Campania) e costituisce invece una nicchia produttiva nelle altre regioni. Le esperienze specifiche si riducono pertanto ad un lavoro ormai datato realizzato molti anni fa dal solo laboratorio del IZSLT (Giangolini et al., 2003). Nella ideazione del presente progetto, si è volutamente cercato di replicare quanto realizzato nella precedente esperienza con il latte bovino al fine di rendere, successivamente, confrontabili i risultati. In sintesi, in base ad un Protocollo analitico predefinito e comune, i laboratori partecipanti (3 delle Unità Operative e 6 collaboratori volontari) hanno analizzato in contemporanea in doppia replica, sia con il Metodo alternativo (Bactoscan FC a cella di flusso) che con quello di riferimento (Plate Count Milk Agar con almeno 3 diluizioni) campioni di latte di massa di bufala prelevati nel proprio territorio di competenza secondo protocolli analitici predefiniti. Per ogni allevamento si è cercato di garantire almeno un trimestre di prelievi (minimo un campione/mese) e su una parte dei campioni si sono determinate alcune analisi aggiuntive (titolo in grasso, proteine, lattosio, cellule somatiche), al fine di disporre anche di elementi per una prima valutazione di eventuali effetti condizionanti sulla rappresentatività statistica della retta di conversione ottenuta. I dati raccolti con foglio elettronico preimpostato sono stati sottoposti ad analisi statistica dalla U.O. n° 1 secondo la procedura descritta nel dettaglio nella relazione seguente i cui punti essenziali e caratterizzanti possono essere così sintetizzati:

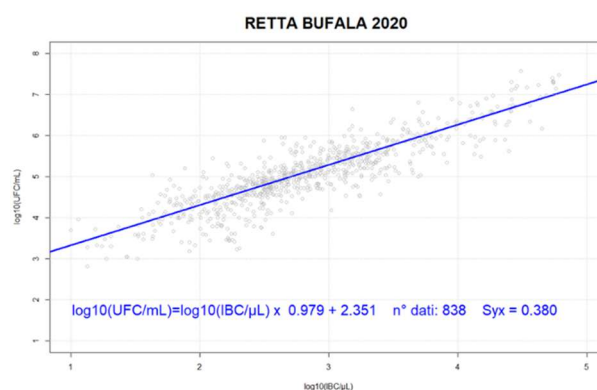
- Valutazione preliminare dei dati strumentali (limiti di ripetibilità; limiti di linearità);
- Valutazione dei dati del Metodo di riferimento (valutazione di ripetibilità e rapporto tra diluizioni);
- Selezione dei dati validi ed individuazione degli esiti *outliers*;
- Stima della retta di regressione secondo il modello lineare ad effetti misti (Linear Mixed Model, considerato tradizionalmente il più adatto all'analisi congiunta dei dati forniti da più laboratori);
- Confronto tra la Retta Bufalina e quella di Conversione Nazionale Bovina;
- Stima preliminare dei fattori di condizionamento (analisi varianza e correlazione) relativa ai dati di composizione, caratterizzazione dell'allevamento, stagionalità;

Rispetto al totale di 894 campioni processati (rappresentanti 219 allevamenti di 8 differenti Regioni) la selezione dei campioni validi ha comportato le seguenti eliminazioni:

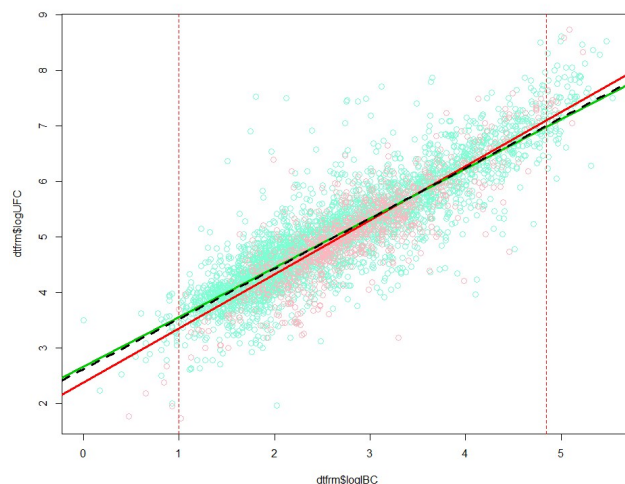
- 5 campioni per limiti ripetibilità (Differenza Critica tra Repliche Log: $> 2.83 S_r P 95\%$); 11 campioni per limiti di linearità strumentale (secondo i criteri indicati in ISO 16297 da noi fissato in base alle precedenti esperienze a > 70.000 Impulsi/uL); 5 campioni per valori inferiori al limite di rilevabilità strumentale (10 Impulsi/uL definito secondo ISO 16297, rispetto ai valori dei Blanks).
- Infine sono stati eliminati ulteriori 6 campioni per mancato rispetto limiti di ripetibilità e 6 campioni per incongruenze o assenza dati nel rapporto diluizioni del metodo di Riferimento.

Con gli 861 "campioni validi" così selezionati si è proceduto ad eseguire dapprima una analisi accessoria di caratterizzazione per singolo laboratorio (di cui si riferisce nei dettagli di seguito) e quindi alla selezione dei valori outliers per la stima complessiva. La selezione (23 campioni eliminati) si è esaurita in un unico step di individuazione di dati con Residuo Standardizzato $> 2,58$ con riduzione della dispersione attorno alla retta di regressione LME da 0,438 S_{yx} a 0,380.

A differenza di quanto avvenuto con la Retta per il latte bovino non si è proceduto ad ulteriori step di eliminazione campioni in considerazione del fatto che nel frattempo le più recenti indicazioni relative a questo tipo di stima statistica danno come obiettivo un valore di $S_{yx} < 0,40$ $\text{Log}_{10} S_{yx}$ rispetto al 0,25 Log_{10} indicato ai tempi del lavoro sul latte bovino (ISO 21187:2007). In conclusione su questa base dati è stata quindi calcolata la retta di regressione per il latte bufalino rappresentata nella Figura 1 seguente:



Una seconda elaborazione dei dati è stata quindi dedicata al confronto tra il risultato del presente progetto e quelli dei due progetti dedicati al latte bovino: dal confronto, di cui si riferisce in dettaglio di seguito in quanto è stato in realtà differenziato nelle modalità di approccio, emerge la situazione graficamente esposta nella Figura 2, seguente in cui la retta Bufalo è rappresentata in rosso e quella bovina in verde:



In estrema sintesi emerge che i due modelli tendono a coincidere per valori compresi tra 5-6 log/ UFC (Asse Y), corrispondenti in termini di unità di misura di riferimento all'intervallo 100.000-1.000.000 UFC/mL. Le differenze, statisticamente significative, appaiono progressivamente lungo il campo di misura ma risultano davvero limitate rispetto alla dispersione complessiva dei dati e, inoltre, diventano evidenti e consistenti soltanto per valori esterni al campo di misura definito (campioni quindi decisamente rari nelle condizioni operative normali con valori < 10 e > 70.000 Impulsi/ul; indicati dalle linee rosse verticali nel grafico precedente). La retta nera tratteggiata indica infine l'andamento di una ipotetica retta di conversione comune per le due tipologie di latte il cui andamento però tende a coincidere con quella Bovina considerata la preponderanza delle relative osservazioni.

A completamento delle attività principale sintetizzata in precedenza, ricordiamo sinteticamente le attività accessorie:

- 1- Ring test tra i Laboratori partecipanti, organizzato dalla U.O. 4, con utilizzo di un materiale di riferimento in matrice latte liofilizzato, al fine di verificare le condizioni operative degli strumenti in uso presso laboratori partecipanti (la prova e la relativa documentazione sono già stati descritti nella Relazione Intermedia; **in Allegato 1** viene pertanto riproposto il solo Report Risultati).
- 2- Elaborazioni accessorie dei dati riferite a quella parte dei campioni per i quali erano disponibili dati aggiuntivi di composizione e dati di caratterizzazione degli allevamenti di provenienza. Considerato il numero limitato di dati disponibili non si considerano conclusivi gli elementi emersi. I risultati ottenuti, dettagliati nella relazione non evidenziano comunque significativi elementi di interferenza con la stima della retta di conversione.

Conclusioni

Il lavoro svolto ha permesso ai due laboratori maggiormente coinvolti nel settore del latte bufalino di disporre di una robusta stima di una modalità di conversione specifica per questa matrice; l'ampliamento del progetto a laboratori operanti in diverse regioni ha permesso anche di ottenere una rappresentazione di condizioni produttive (ed ambientali) diverse e pertanto di stimare una modalità di Conversione Unica applicabile a livello nazionale comprese dunque aree in cui l'allevamento del bufalo rappresenta una nicchia produttiva, obiettivo primario del progetto.

L'analisi statistica di confronto con il risultato del lavoro svolto in precedenza per il latte bovino ha permesso di raccogliere indicazioni che potranno avere notevole importanza pratica, al di là del loro significato tecnico-scientifico. E' infatti emerso che, tenuto conto ovviamente dell'errore di stima proprio di questo tipo di elaborazioni (evidenziato dalla distribuzione delle due "nuvole" di dati nella figura precedente) la differenza tra le due modalità di conversione appare decisamente contenuta e riguardante soltanto campioni con livelli di contaminazioni estremi. Considerate le difficoltà operative di gestire Conversioni diverse in un medesimo laboratorio con un unico strumento, in

funzione della matrice analizzata, possiamo quindi concludere con le seguenti indicazioni pratiche:

- I laboratori che analizzano esclusivamente o prevalentemente latte bufalino possono adottare la Conversione Bufalina in tutto il territorio nazionale (conducendo eventualmente verifiche periodiche in ambito locale);
- I laboratori che analizzano occasionalmente o eccezionalmente latte bufalino possono analizzare questi ultimi con la medesima Conversione Nazionale utilizzata per il latte bovino consapevoli che l'effetto matrice appare decisamente trascurabile rispetto al complesso degli elementi di variabilità propri della conversione;
- Nel caso di laboratori che analizzano in modo equivalente le due matrici l'opzione principale è ovviamente quella di applicare due conversioni differenziate in diversi strumenti o in canali operativi differenziati nello stesso strumento; è comunque da sottolineare che anche nel caso si operi con un'unica Conversione entro il campo di misura indicato, l'errore indotto sull'esito finale dei due tipi di latte appare contenuto in particolare se lo si confronta con gli altri elementi che partecipano all'incertezza di misura di tutti i metodi di conteggio microbiologico compreso ovviamente quello di riferimento per la carica batterica totale.

Bibliografia Essenziale sull'argomento :

- 1- Bolzoni G. et al.(2000) - Evaluation of the BactoScan FC. 1: Accuracy, comparison with the BactoScan 8000 and somatic cells effect [Journal] // Milchwissenschaft. - februar 2000. - 2: Vol. 55. - pp. 67-70;
- 2- Bolzoni G. et al. (2001) - Evaluation of the Bactoscan FC. Second part: ' Repeteability, Carry-Over and Linearity' [Journal] // Milchwissenschaft. - june 2001. - 6: Vol. 56. - pp. 318-321;
- 3- Bolzoni G. and Marcolini A. (2010) - Bactoscan FC - Project for unified conversione line in Italy [Journal] // Milchwissenschaft. - 2010 - Vol. 65. - pp. 309-310;
- 4- Bolzoni G., Marcolini A., Delle Donne G., Appicciafuoco B., Ferrini A. M. 2015. New National conversion line for Bactoscan FC in Italy: a step forward. Ital. J. Food Sci. 27(2): 191-197.
- 5- Bolzoni G., Marcolini A., Fontana A., Monaco L., Ferrini A. M. 2017. Bactoscan FC: conversion system for results at the national level in Italy and reproducibility of total bacterial count testing four years after implementation. EU Magazine 2:46-54.
- 6- Shuren, G., Reichmuth J., Heeschen W. 1991. Bactoscan Technique. FIL-IDF 256:1991.
- 7- Shuren G., Walte H.G. 2000. First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in row milk. Bull. Int. Dairy Fed. 358:36-48.
- 8- Shuren G. (2001) – Bacteriological quality of raw milk: conversion of bactoscan-FC counts onto the scale of the official method. Milchwissenschaft 56 (7): 380-387
- 9- Trossat PH., Leray E., Rollier P.: In “Evaluation of Bactoscan FC”. Ed. Cevalait, 11–27 (1998)
- 10- Tomanska M. (2004) – Verification study on Bactoscan FC counts conversion onte the scale of the reference method. Milchwissenschaft 59 (5/6), 261-262
- 11- Giangolini G., Ammatiste S. Proietti A., Boselli C., Pietrini P., Rosati R.- Evaluation of bactoscan FC for determination of total bacterial count in buffalo raw milk : comoparisono with bactoscan 8000 – Atti II Convegno nazionale sull' allevamento del bufalo , Monterotondo (Roma) 28-30 Agosto, pp. 137-142;

Riferimenti Rapporto : Dr. Giuseppe Bolzoni ; **Mail** ; Tel 0039030229541 IZSLER, Centro Referenza nazionale Qualità latte Bovino , Via Bianchi 9, Brescia

Parole Chiave : Latte, Bufalo, Carica Batterica, Conversione