



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Centro di Referenza Nazionale per
la qualità del latte e dei Prodotti
Derivati degli Ovini e dei Caprini

Equazioni di conversione per la determinazione della carica batterica del latte ovino e caprino: utilizzo di apparecchiature automatiche operanti in citometria di flusso e risultati dello studio sulla fosfatasi nel latte ovino

**Aggiornamento sulle metodiche analitiche e attività di ricerca del Centro di Referenza
Nazionale per la Qualità del Latte e dei Prodotti Derivati degli Ovini e dei Caprini**

Roma, 9 Giugno 2016

Gilberto Giangolini



Conversione del numero di Impulsi/ml (metodo di routine) in UFC/ml (metodo di riferimento)

NORMA DI RIFERIMENTO

**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**

Prevede una organizzazione dove ambedue i metodi siano eseguiti
nello stesso laboratorio.

I due metodi sono effettuati da più laboratori

La conversione più robusta sarà ottenuta se le prove saranno
condotte sullo stesso campione, nello stesso laboratorio e nello
stesso tempo.



PROTOCOLLO PER L'ESECUZIONE DELLE PROVE

- Utilizzo di campioni di latte di massa senza conservante
- Conservazione dei campioni a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ fino al momento dell'analisi
- Analisi eseguite entro 36 ore dal prelievo
- Analisi dei campioni senza eseguire sub-aliquote
- Analisi dei campioni con i due metodi a temperatura ambiente senza riscaldamento
 - Misura degli IBC al Bactoscan FC in rapida successione
 - Determinazione della Carica Batterica entro 10 minuti ed in condizioni di ripetibilità con il metodo ISO 4833-1:2013 utilizzando 2 piastre per ogni diluizione
- Registrazione dei dati grezzi su foglio Excel appositamente predisposto



Laboratori partecipanti (Totale n.12)

Laboratorio		Ovini	Caprini
Ass.All.F.V.G.	Codroipo (UD)	x	x
A.R.A. Sardegna	Oristano	x	x
Centro Agr. Reg. ASSAM	Jesi (AN)	x	x
CONCAST Trentingrana	Trento		x
Granarolo S.p.A.	Bologna	x	x
IZS Lazio e Toscana	Grosseto	x	
IZS Lazio e Toscana	Roma	x	x
IZS Lombardia e Emilia Romagna	Brescia	x	x
IZS Piemonte Liguria e Valle D'Aosta	Torino	x	x
IZS Sardegna	Sassari	x	
IZS Sicilia	Palermo	x	
IZS Umbria e Marche	Perugia	x	
		11 Lab.	8 Lab.





LATTE OVINO

Il lavoro è stato eseguito unendo i dati derivanti dalla prova precedente eseguita da **5 laboratori nel 2012** e la nuova prova eseguita da **6 laboratori**.

LATTE CAPRINO

Il lavoro è stato eseguito da **8 laboratori**.



Determinazione del numero di campioni da analizzare

la determinazione della carica batterica totale mediante l'apparecchiatura Bactoscan FC è influenzata da diversi fattori quali i tipi di batteri e la loro fase di crescita, le condizioni di conservazione, le influenze regionali, le condizioni di produzione e le influenze stagionali.

$$n = \left[\frac{t^2 \cdot (1 - r^2)}{(\delta^2 \cdot r^2)} \right] + 1$$

t = valore corrispondente alla distribuzione t-Student al livello di confidenza dl 95%

δ = valore dell'errore relativo alla regressione da stimare ($\delta = 0,1$ è considerato appropriato dalla norma ISO 21187:2004)

r = valore presunto del coefficiente di correlazione tra i risultati dei due metodi

Il numero dei campioni dovrebbe essere sufficiente a rappresentare le variazioni che possono derivare dai fattori che influenzano la conversione.



ISO 21187:2004

δ	r	Numero campioni
0,1	0,5	1153
0,1	0,55	887
0,1	0,6	684
0,1	0,65	526
0,1	0,7	401
0,1	0,75	300
0,1	0,8	217
0,1	0,85	149
0,1	0,9	91
0,1	0,95	43



BASE DATI

OVINI

	REPORT 2012	REPORT 2016	TOTALE
LABORATORI	5	6	11
CAMPIONI	340	144	484

CAPRINI

			TOTALE
LABORATORI			8
CAMPIONI			638





VERIFICHE PRELIMINARI

Strumentali (Bactoscan FC)

Linearità

Ripetibilità (Prova in doppio)

Metodo di riferimento (ISO 4833-1:2013)

Verifica della proporzionalità dei conteggi

Verifica prova in doppio



LINEARITA' Bactoscan FC

E' stata verificata la linearità strumentale fino a 50.000 impulsi/μL

Regressione lineare tra valore atteso e valore reale

$$rL = \frac{(\Delta C_{\max} - \Delta C_{\min})}{(C_{\text{mean, max}} - C_{\text{mean, min}})} \times 100$$

ISO 16297:2013 – IDF 161:2013

Milk – Bacterial count – Protocol for the
evaluation of alternative methods

ΔC_{\max} = Valore massimo dei residui della regressione

ΔC_{\min} = Valore minimo dei residui della regressione

C means, max = valore medio massimo misurato

C means, min = valore medio minimo misurato



LINEARITA'

Bactoscan FC

Latte Ovino

$$rL = \frac{(\Delta C_{\max} - \Delta C_{\min})}{(C_{\text{mean, max}} - C_{\text{means, min}})} \times 100 = 4,35\%$$

Latte Caprino

$$rL = \frac{(\Delta C_{\max} - \Delta C_{\min})}{(C_{\text{mean, max}} - C_{\text{means, min}})} \times 100 = 4,6\%$$

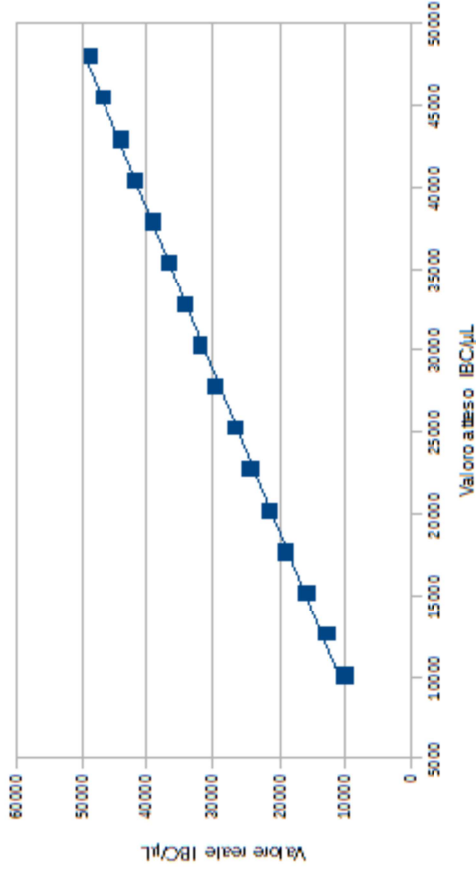
ΔC_{\max} = Valore massimo dei residui della regressione

ΔC_{\min} = Valore minimo dei residui della regressione

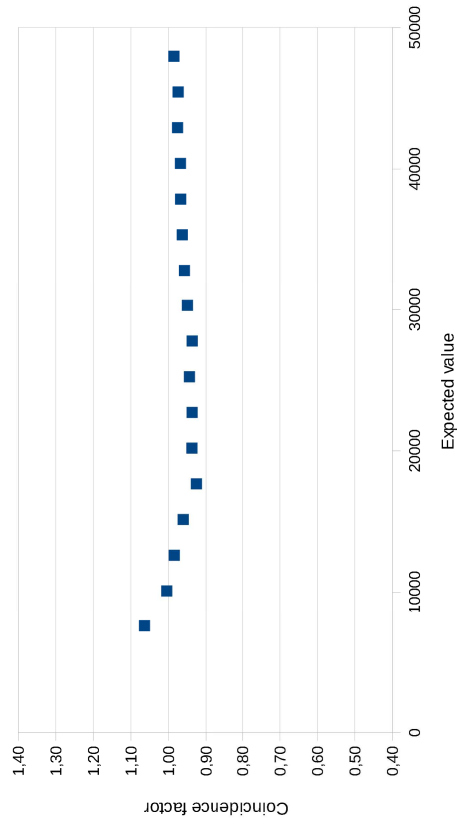
C means, max = valore medio massimo misurato

C means, min = valore medio minimo misurato



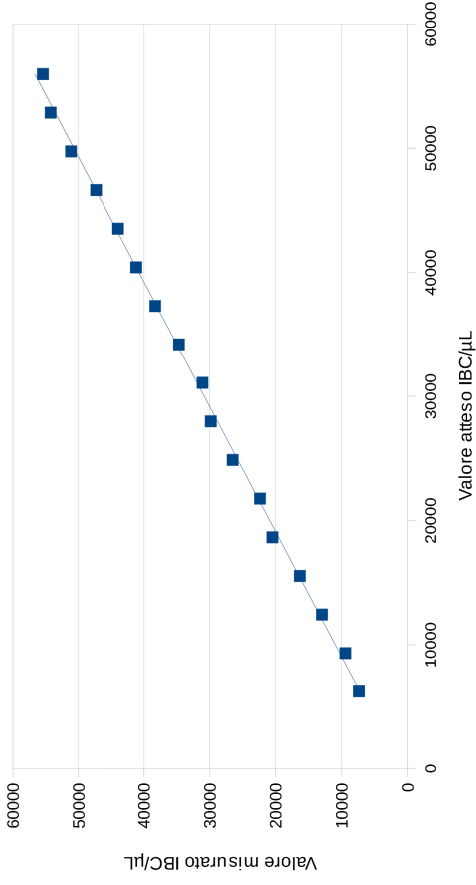


Latte Ovino
Regressione tra valore atteso e valore
osservato
($R^2 = 0,998$)



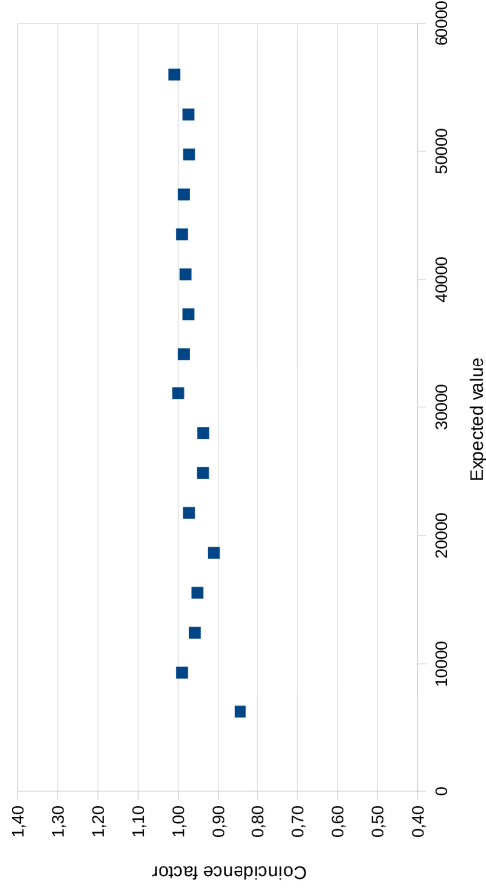
**Rapporto tra valore atteso e
valore osservato**





Latte Caprino

Regressione tra valore atteso e valore osservato ($R^2 = 0,998$)



Rapporto tra valore atteso e valore osservato



Campo di misura

Limite inferiore considerato: 10 IBC/ μ L

Limite superiore considerato: 50.000 IBC/ μ L



Ripetibilità dei conteggi strumentali (Prova in doppio)

I risultati dei campioni eseguiti in doppio sono risultati non idonei se la differenza tra i due risultati superava $2,83 * Sr$ (log) del Bactoscan presa come riferimento.

Range IBC/ μ L	Sr (log) Bactoscan FC
10-50	0,08
51-200	0,06
>200	0,05



Ripetibilità dei conteggi (Prova in doppio) ISO 4833-1:2013 “Microorganismi a 30°C”

1) Verifica della proporzionalità dei conteggi

Valutazione della linearità

$$G_{m-1}^2 = 2 * \left[\sum_{i=1}^m \left(c_i \ln \frac{c_i}{R_i} \right) - \left(\sum_{i=1}^m c_i \right) \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^m c_i}{\sum_{i=1}^m R_i} \right) \right]$$

Valutazione della dispersione
dei risultati nelle repliche della
stessa diluizione

$$K_p = \frac{|C_1 - C_2|}{\sqrt{(C_1 + C_2)}}$$

conteggio alla prima diluizione	156	168
conteggio alla seconda diluizione	14	12





Ripetibilità dei conteggi (Prova in doppio) ISO 4833-1:2013 “Microrganismi a 30°C”

2) Verifica della ripetibilità – Prova in doppio

$$r = 0,25 \log (\text{rapporto } 1,8 \text{ in scala numerica normale})$$



Calcolo della conversione ISO 21187:2004 Modello di regressione lineare

OUTLIERS

Con le medie dei risultati idonei è stata calcolata
la regressione lineare

Sono stati eliminati i campioni che presentavano
uno scarto standardizzato $> |2,58|$

Gli outliers sono stati scartati e ricalcolata la
regressione lineare



Campioni eliminati in seguito ai controlli preliminari

	Ovini	Caprini
Prova in doppio strumentale e Range:	12	10
Proporzionalità conteggio e Prova in doppio:	7	27
Ouliers	8	20
Tot. Campioni	27 (5,6%)	57 (8,9%)



Distribuzione in classi di UFC/ml dei 457 campioni ovini e 581 caprini, utilizzati per il calcolo della regressione - CBT Metodo di riferimento

Limiti CBT (media geometrica): <500.000 ufc/ml
<1.500.000 ufc/ml

Distribuzione dei campioni utilizzati in classi di UFC/ml	% OVINI	% CAPRINI
<100.000	27,1	31,7
100.000-500.000	31,7	28,4
500.000-1.000.000	14,9	11,2
>1.000.000	26,3	28,7



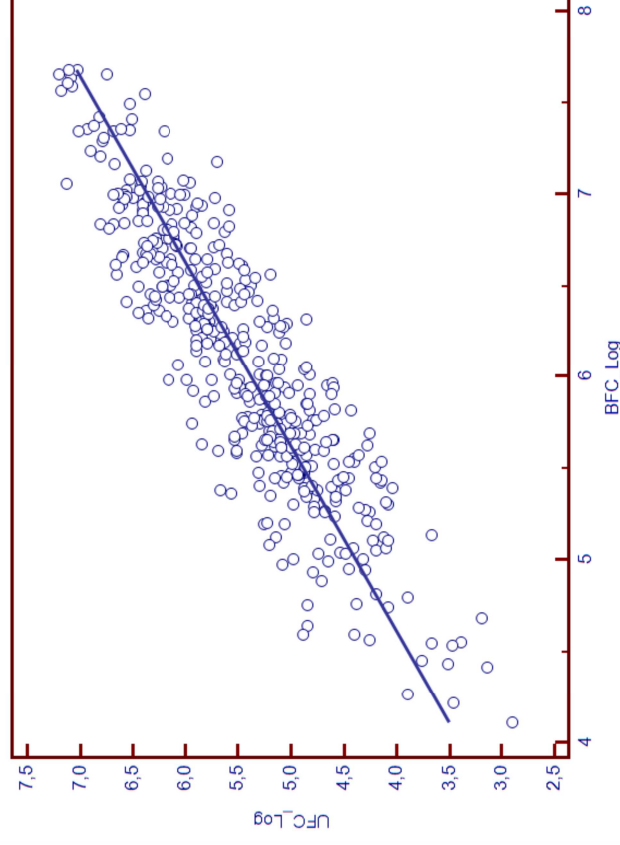
Distribuzione in classi di IBC/ μ L dei 457 campioni ovini e 581 caprini, utilizzati per il calcolo della regressione - Bactoscan

Distribuzione dei campioni utilizzati in classi di IBC/ μ L	% OVINI	% CAPRINI
<100	5,5	5,9
100-1.000	42,2	34,2
1.000-3.000	21,4	20,0
3.000-5000	9,5	11,2
5.000-10.0000	13,1	12,7
10.000-50.000	8,3	16,0



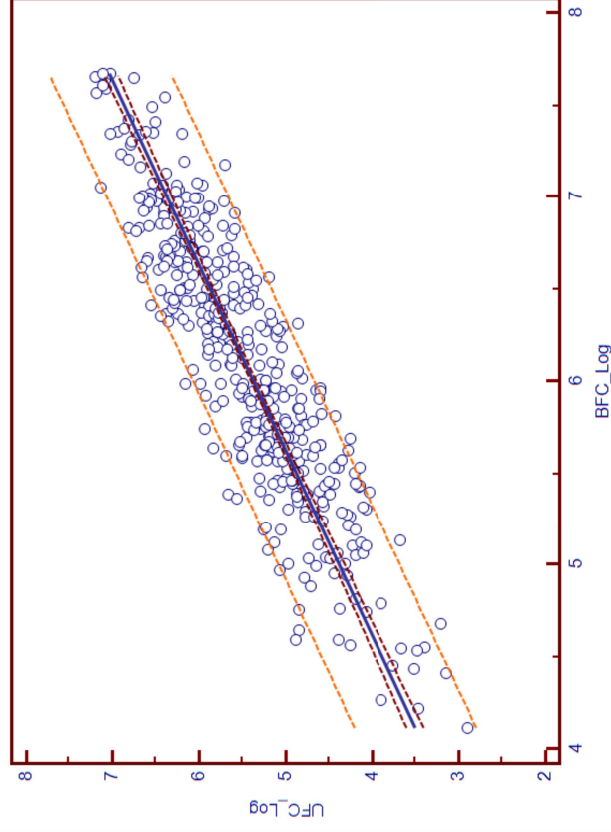
Stima della retta di regressione latte OVINO

$$\text{Log}_{10} \text{ UFC/ml} = \text{Log}_{10} (\text{IBC/ml}) * 0,9906 - 0,5627$$



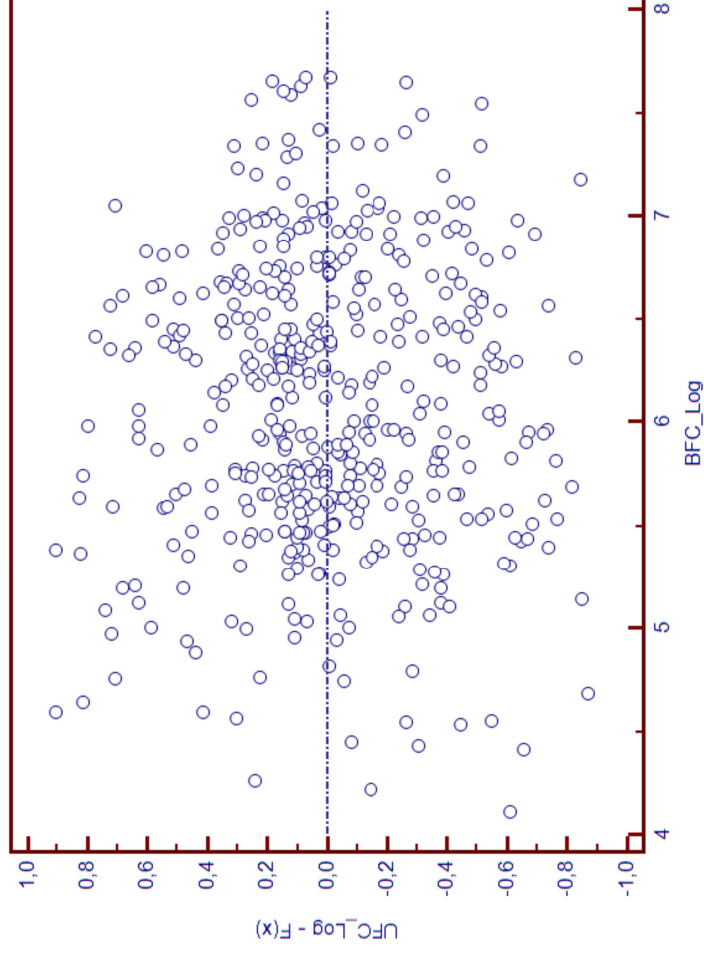
N° CAMPIONI	CORRELAZIONE r_Pearson	R ²	Sy:x
457	0.89	0.79	0.355





OVINI

Diagramma di dispersione, retta di regressione e intervallo predittivo (95%) tra log UFC/ml e log Impulsi BFC/ml

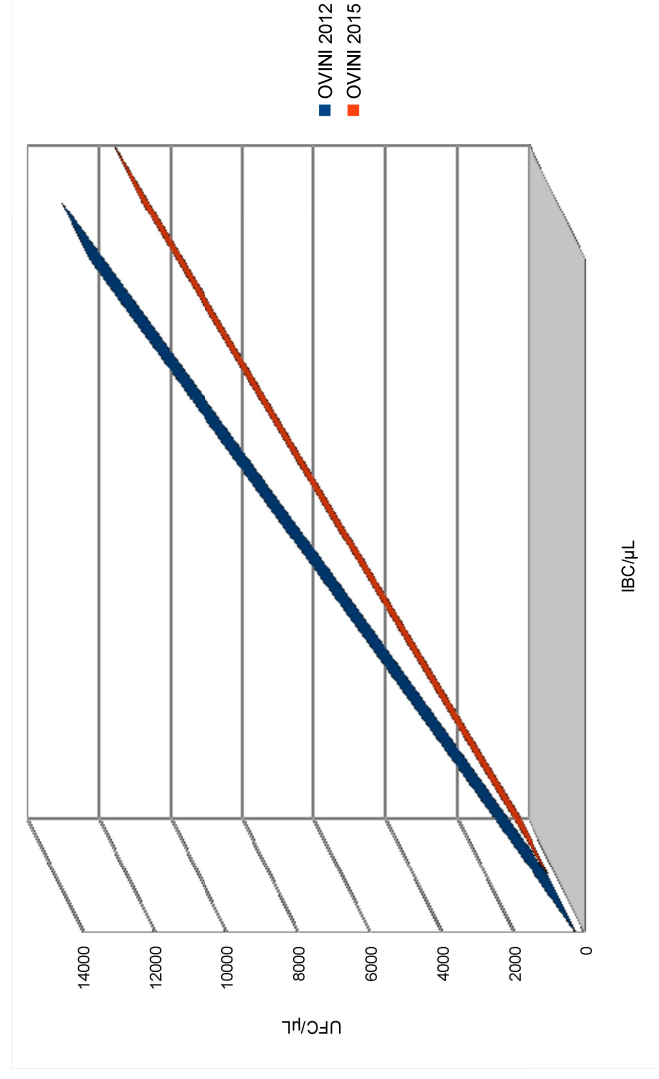


OVINI

Diagramma di dispersione dei residui

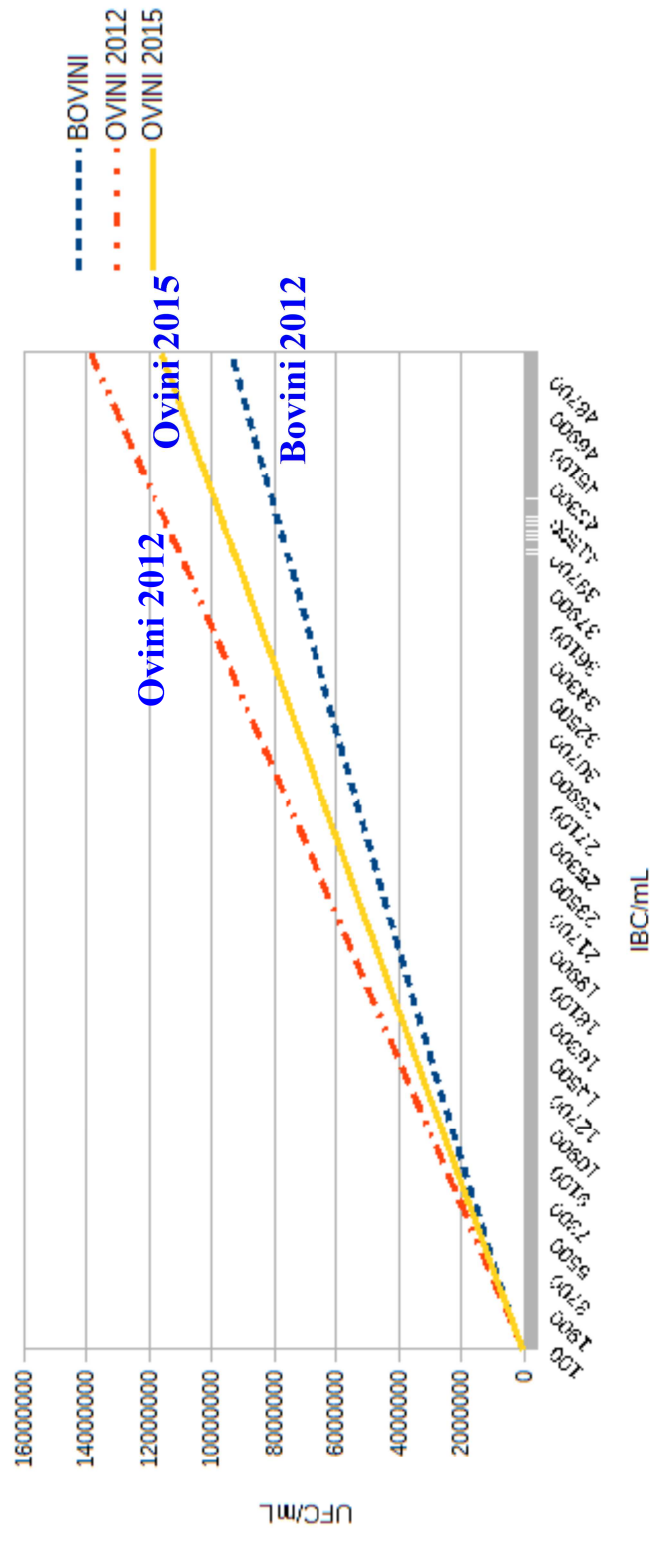


Effetti pratici della nuova conversione Latte ovino

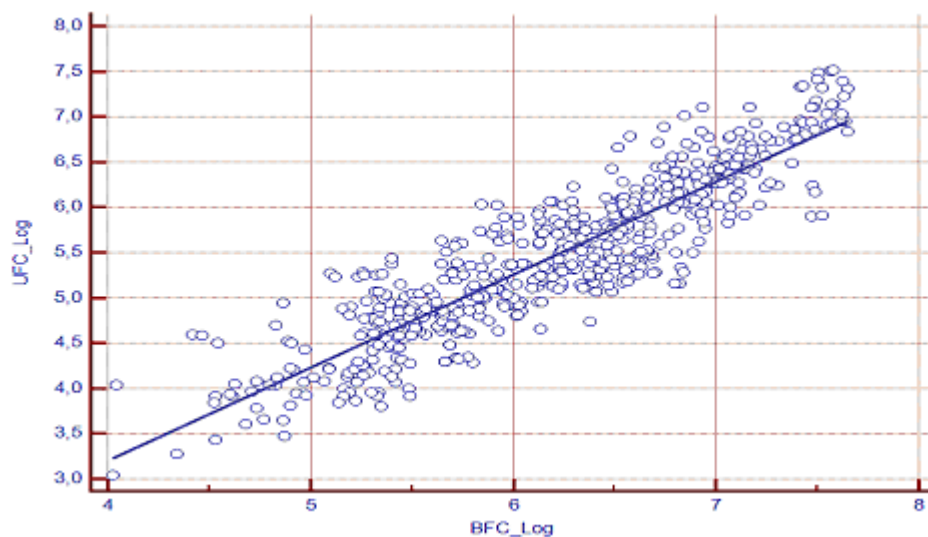


Fornisce risultati inferiori tra il 5% ed il 16%



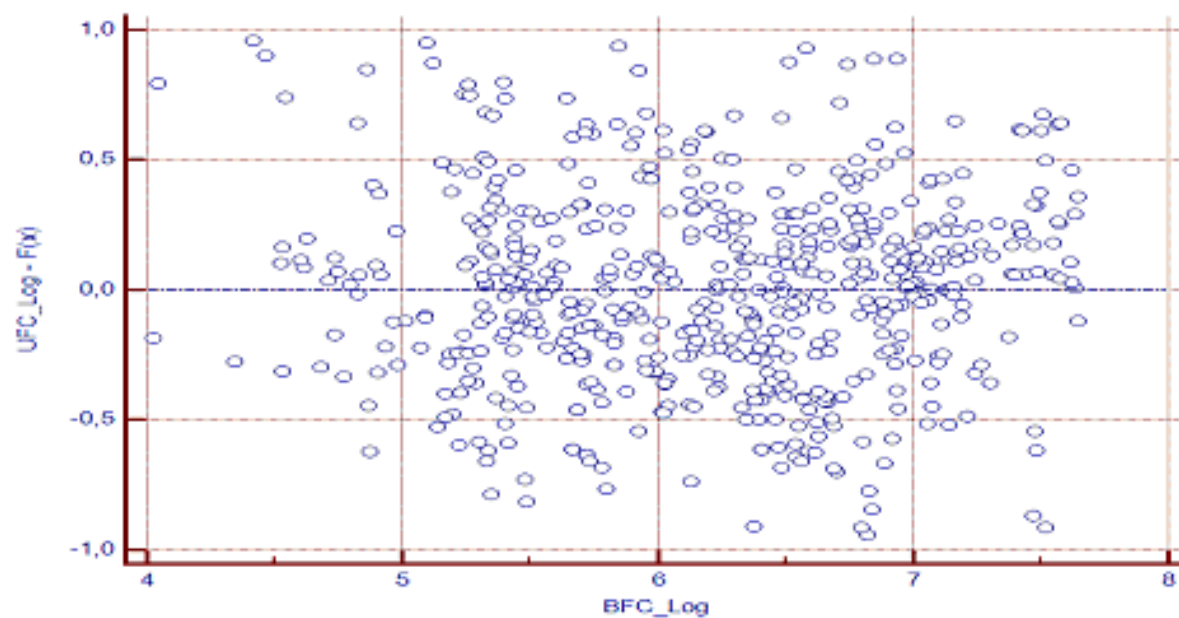


Stima della retta di regressione latte **CAPRINO**



$$\text{Log}_{10} \text{ UFC/ml} = \text{Log}_{10} (\text{IBC/ml}) * 1,0274 - 0,9060$$

N°campioni	Correlazione (r_Pearson)	R ²	Sy:x
581	0,90	0,812	0,37



CAPRINI

Diagramma di dispersione dei residui



Conversioni per il latte caprino

Nazionale 2016 $\text{Log}_{10} \text{ UFC/ml} = 1,0274 \times \text{Log}_{10} (\text{IBC/ml}) - 0,9060$
($\text{Sy:x}=0,37$)

Ramsahoi -
2011

$$\text{Log UFC} = 0,9593 \times \text{Log BsnFC} - 0,8079$$

$R^2 = 0.705$

Fonte: Journal of Dairy Science - Volume 94, Issue 7, July 2011, Pages 3279–3287

(Ontario Milk Act Regulation 761; 50.000 cfu/mL)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



INFLUENZA DELLE CELLULE SOMATICHE



Studio dell'influenza delle cellule somatiche latte OVINO

Livello medio delle cellule somatiche presenti nel latte di massa ovino:
1.200.000 cell/ml

Considerati 197 campioni con CBT <500.000 ufc/ml
determinata con il Metodo ufficiale

Classi di Cell. Somatiche (cell/ml x 1000)	% CAMPIONI
<1000	36,5
1.000 – 2.000	47,8
>2.000	15,7

Correlazione Impulsi -
Cellule somatiche

$$r = 0,66 \text{ (} P < 0,001 \text{)}$$



Studio dell'influenza delle cellule somatiche latte CAPRINO

Considerati 273 campioni con CBT <500.000 ufc/ml
determinata con il Metodo ufficiale

Classi di Cell. Somatiche (cell/ml x 1000)	% CAMPIONI	Correlazione Impulsi - Cellule somatiche
<1000	27,7	$r = 0,11$ ($P < 0,07$)
1.000 – 2.000	51,1	
>2.000	21,2	





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



FOSFATASI ALCALINA LATTE OVINO E CAPRINO

Limite di legge latte bovino: 350 mU/L

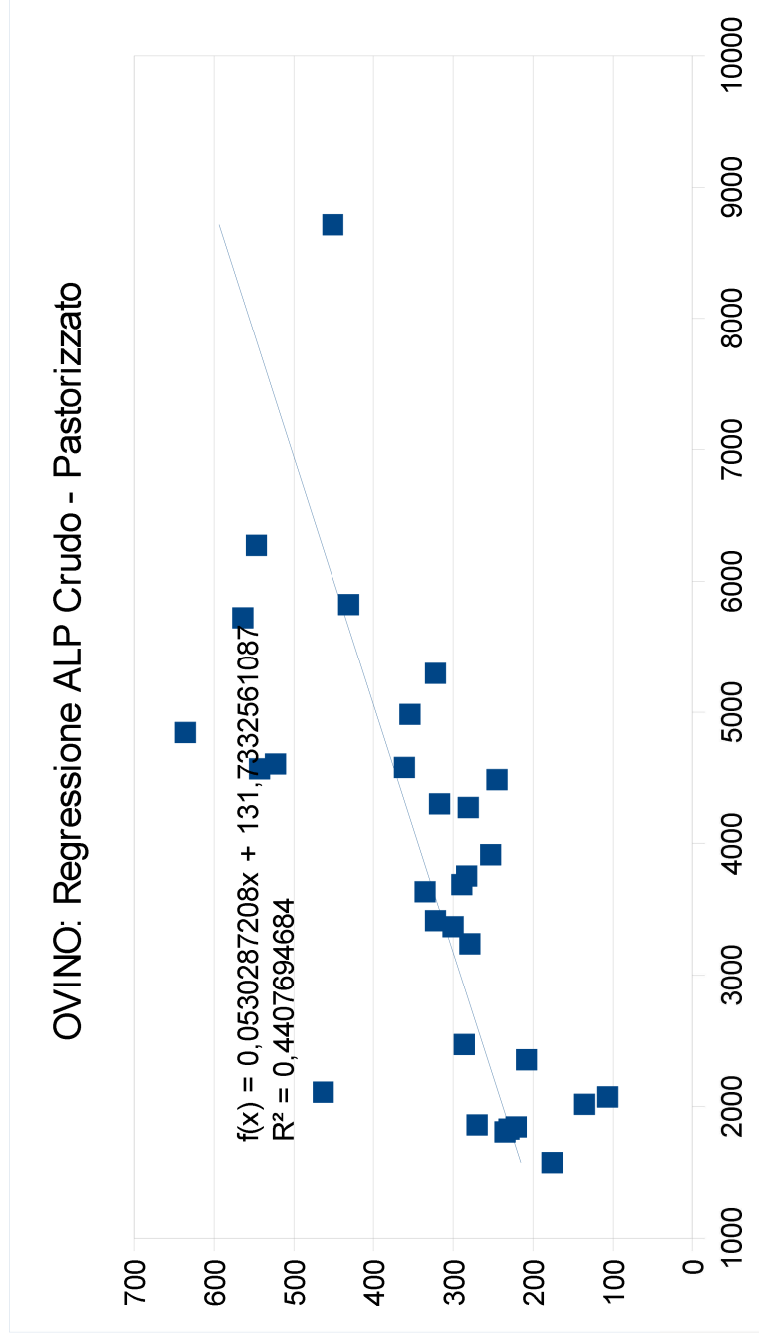


Pastorizzazione 63°C per 30 minuti

Pastorizzazione 72°C per 15 secondi

Il 30-40% della fosfatasi alcalina è legata ai globuli di grasso

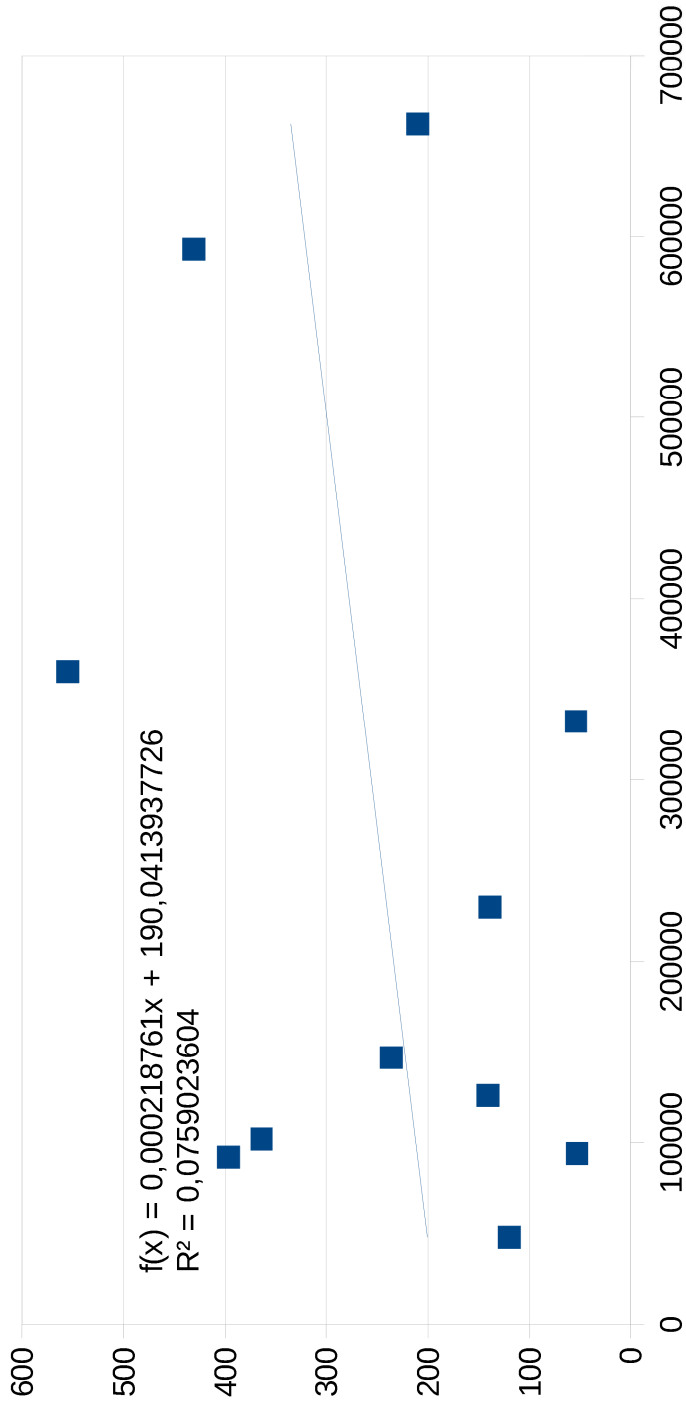




$$r_{\text{Pearson}} = 0,66$$



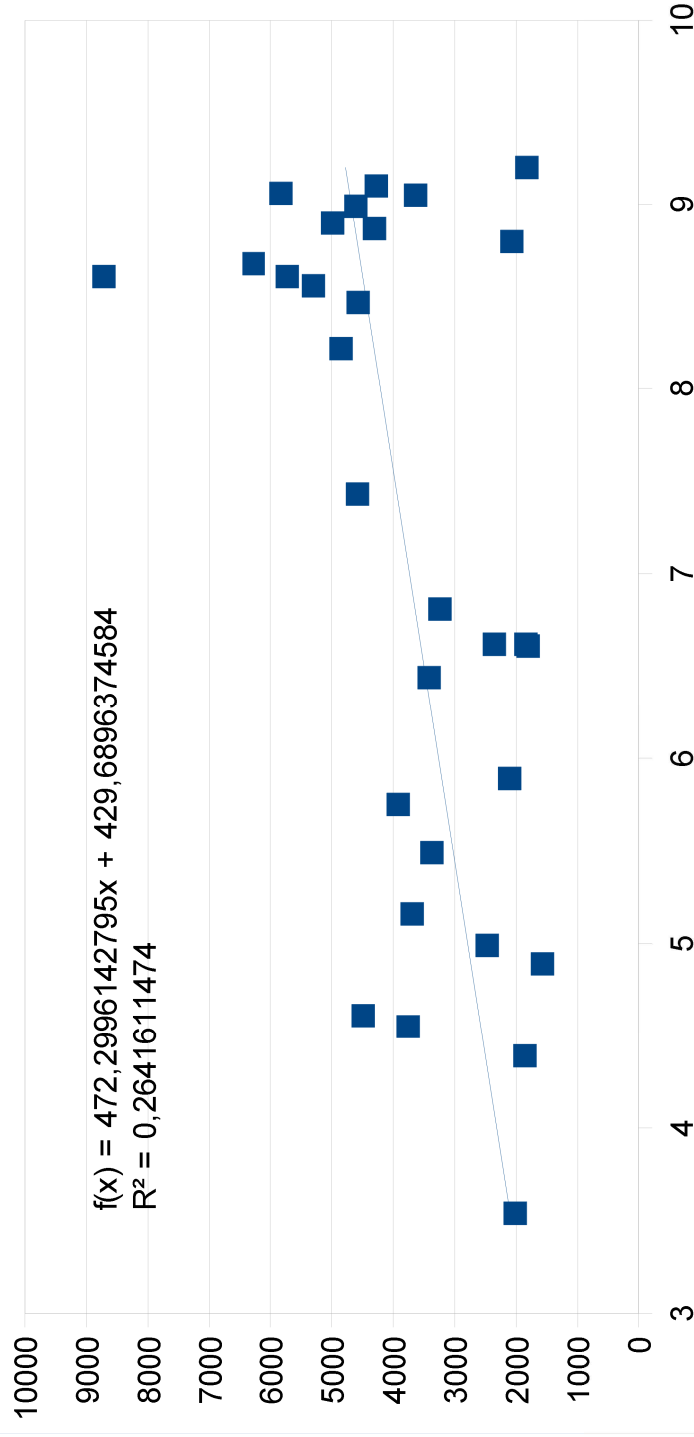
CAPRA: Regressione ALP Crudo - Pastorizzato



$$r_{\text{Pearson}} = 0,27$$

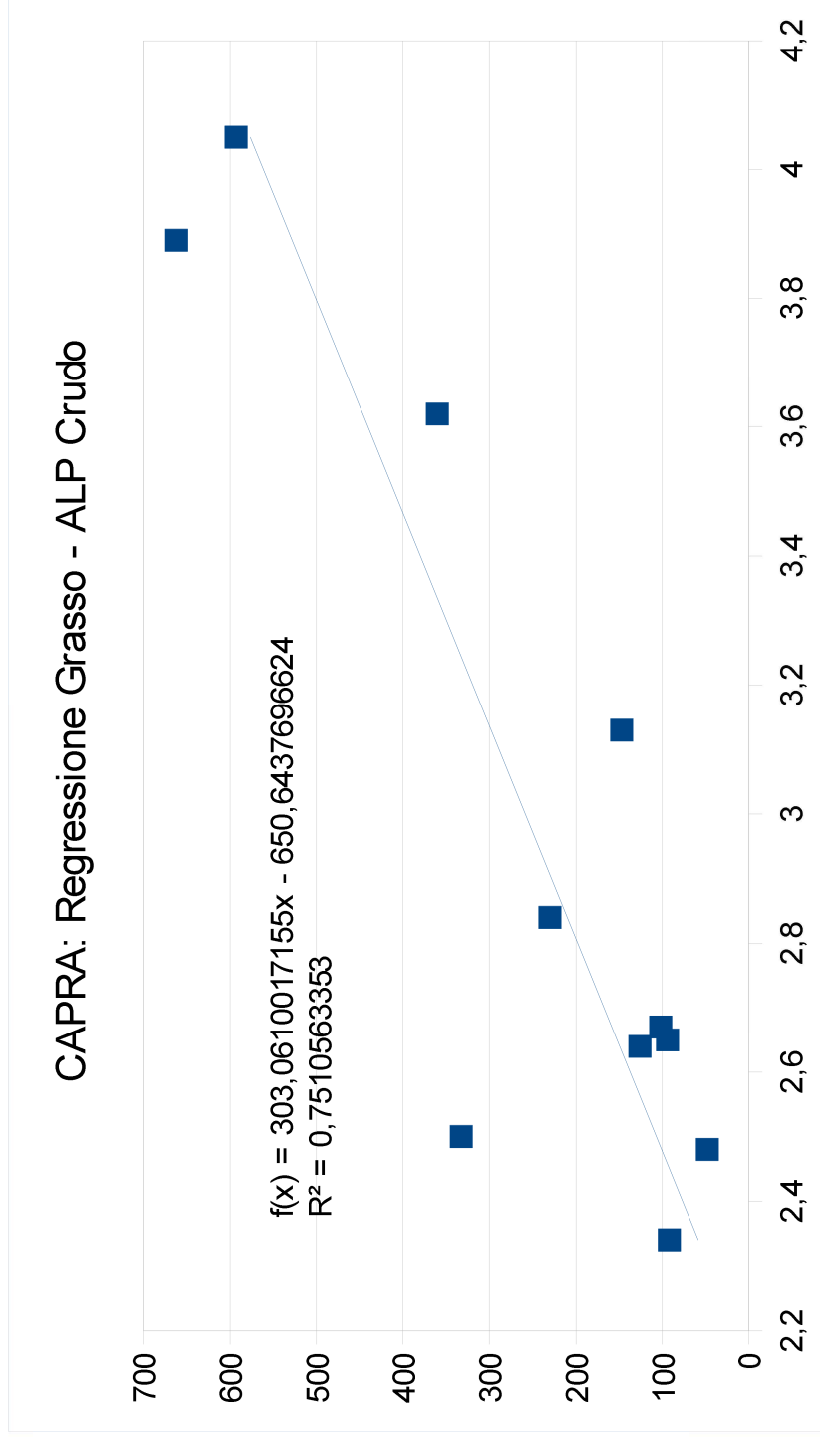


OVINO: Regressione Grasso - ALP Crudo



$$r_{\text{Pearson}} = 0,51$$





$$r_{\text{Pearson}} = 0,87$$



Ring Test Fosfatasi alcalina Fluorophos e Kit

MEDIA	168	526	1251	1825
d.s.	32	72	172	273
Mediana	175	530	1257	1865
Min	125	442	1088	1506
Max	198	603	1404	2064

Riproducibilità “R”

ISO 11816-1:2006

Livello	20	40	100	350	500
Sheep milk	16,63	20,34	46,63	170,24	233,1

Livello	200	500	1300	1800
	75,43	185,80	410,60	673,11



Conclusioni

- Campioni di latte di massa prelevati durante tutto l'arco della lattazione

(ridurre al minimo le variabilità dovute alla stagionalità delle produzioni)

- LATTE OVINO: ottenuta una regressione con un'accuratezza migliore

($Sy:x = 0,355$) Precedente (2012) $Sy:x = 0,41$

Anche l'accuratezza della regressione per il latte CAPRINO rientra nei parametri raccomandati (European Union Reference Lab. for Milk and Milk Products)

$Sy:x = 0,37$



- Studi ulteriori e mirati sono necessari per valutare l'influenza del contenuto in cellule somatiche/corpi citoplasmatici sul conteggio degli IBC da parte del Bactoscan FC.
- Sarebbe auspicabile proseguire nelle prove di comparazione per cercare di arrivare al punto in cui l'aggiunta di ulteriori dati non determini una sostanziale modifica della conversione.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Grazie dell'attenzione

