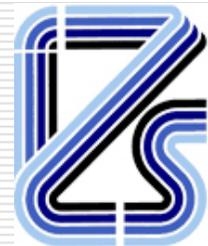


XI° MEETING A.I.A
Responsabili e Tecnici dei Laboratori
del settore lattiero caseario
24-25/11/11

**Aggiornamento equazione di conversione CBT per strumenti
optofluoroelettronici**

A. Ferrini - Istituto Superiore Sanità – Roma
G. Bolzoni – Centro Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino –
IZSLER – Brescia



Breve cronistoria

- ❑ Anni 80 – disponibilità strumenti optofluorometrici per Carica Batterica Totale nel latte crudo. Principale problema “conversione”
- ❑ Fine Anni 80 – Si stabilisce la possibilità di definire la curva attraverso una linea spezzata (software strumentale)
- ❑ Inizio Anni 90 – Si dimostra l’idoneità di una regressione lineare (Grappin)
- ❑ Anni 90- Si diffondono Rette di Regressione per Singolo Laboratorio – Compiono strumenti e modelli diversi
- ❑ Anni 2000 - Norme Internazionali per Validazione della Conversione si ufficializza il concetto di “base geografica x singolo laboratorio”
- ❑ 2008 -2010 - Progetto Conversione Unica Nazionale
estensione del concetto di base geografica basata su un assioma
indimostrabile ed incontestabile
- ❑ 2011 – Si comincia a parlare di una modalità unica internazionale



Principali effetti positivi della Conversione Unica

- ❑ Uniformità tra Laboratori (conseguenza pratiche quotidiane)
- ❑ Validazione singola (suddivisione del lavoro passato e futuro)
- ❑ Possibilità di “adozione” con necessità di sola verifica (elaborazione ad effetti misti)
- ❑ Maggior peso internazionale
- ❑ Bilancio costo beneficio decisamente positivo

Che effetto ha avuto finora ?



I Ring-Test A.I.A (2008 -2011) come indicatore

* 2008 – sostanziale scomparsa Bactoscan 8000

IMPULSI

Dispersione fra medie di laboratorio in % su singolo campione

camp.	Lab. Utili	Media	r	R	Sr	SR	RSDr	RSDR	RSDL	
1	feb-08	30	407	39,95	169,27	14,12	59,81	3,47	14,71	14,30
2	feb-08	30	903	61,23	499,78	21,64	176,60	2,40	19,57	19,42
3	feb-08	29	2426	194,72	2294,71	68,81	810,85	2,84	33,43	33,31
4	feb-08	30	172	28,83	87,28	10,19	30,84	5,92	17,93	16,92

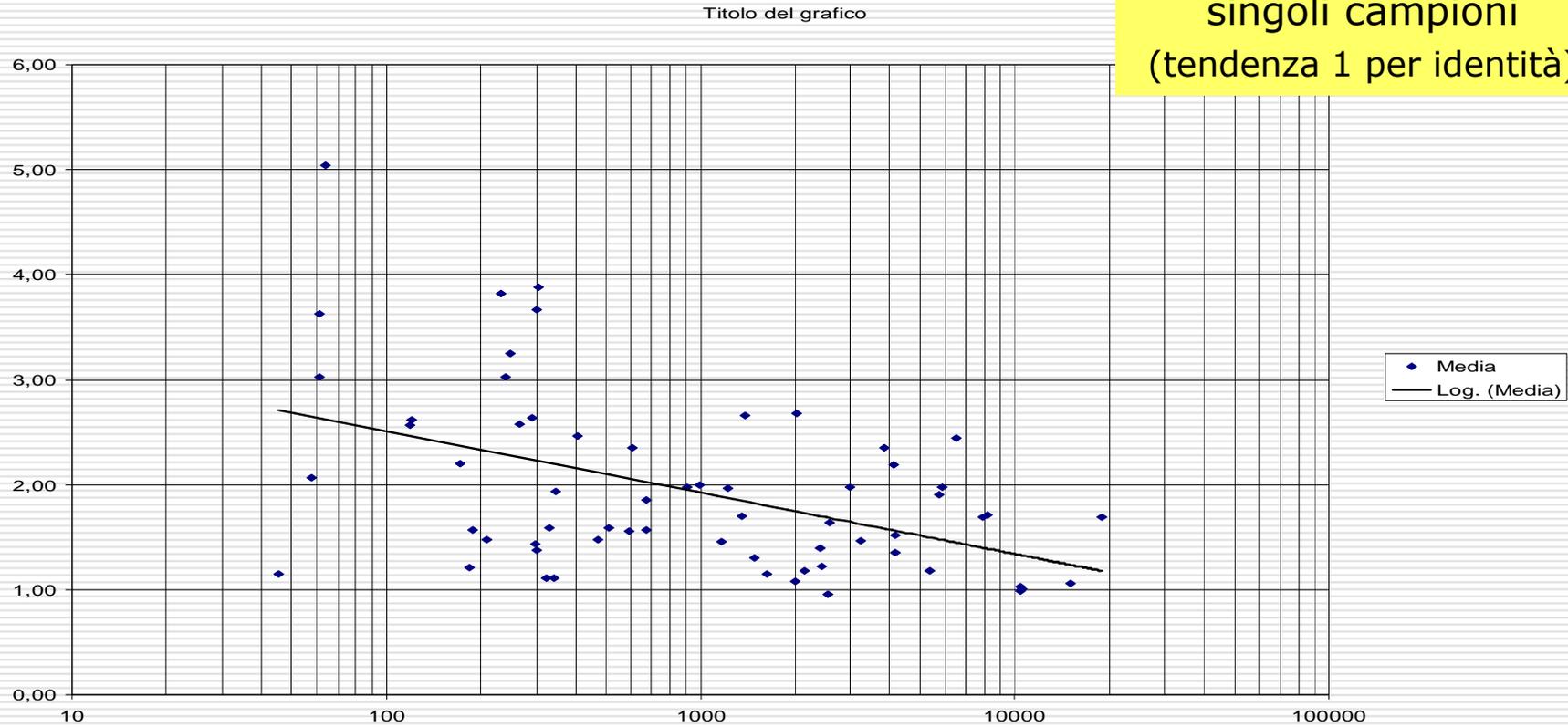
CFU

camp.	Lab. Utili	Media	r	R	Sr	SR	RSDr	RSDR	RSDL	
1	feb-08	30	103	8,33	103,46	2,94	36,56	2,85	35,41	35,30
2	feb-08	31	222	12,88	240,77	4,55	85,08	2,05	38,34	38,28
3	feb-08	28	511	30,52	591,27	10,78	208,93	2,11	40,87	40,81
4	feb-08	31	47	7,82	50,38	2,76	17,80	5,84	37,66	37,20



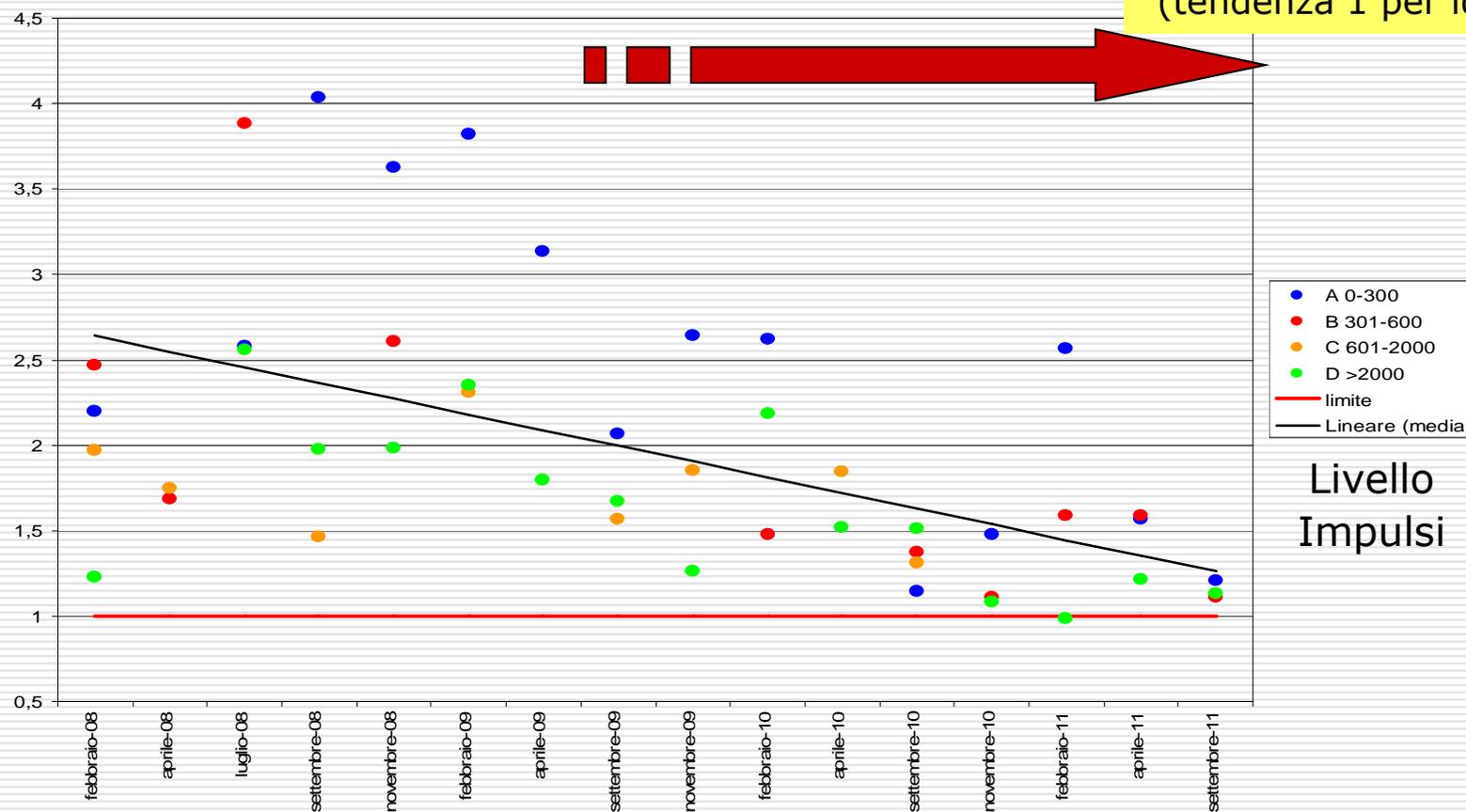
Ring- Test A.I.A come indicatore

Rapporto tra RSDL
Impulsi e CFU per
singoli campioni
(tendenza 1 per identità)



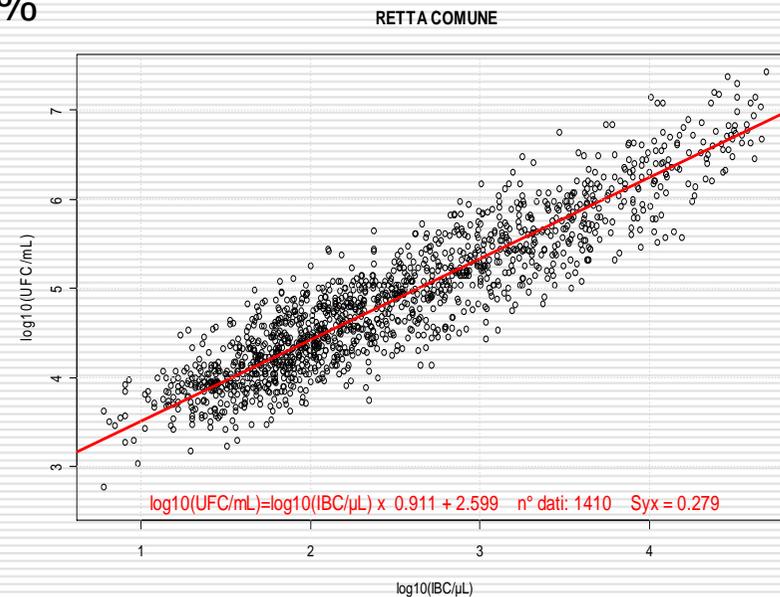
Ring- Test A.I.A come indicatore

Rapporto tra RSDL
Impulsi e CFU nel
tempo
(tendenza 1 per identità)



Cosa è stato fatto dopo la conclusione del progetto

- Applicazione progressiva in circa 65 % dei Lab (80 % latte controllato)
- Pubblicazioni (2)
- Supporto tecnico statistico
- Supporto informativo
- Collaborazione con I.S.S. e presentazione risultati al Meeting dei laboratori nazionali di referenza (AFSSA)
- Contatti preliminari per estensione internazionale (Slovenia e Malta)



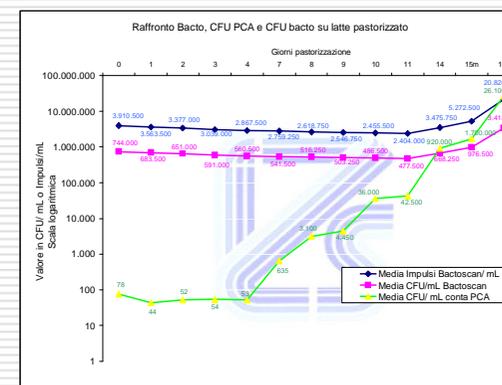
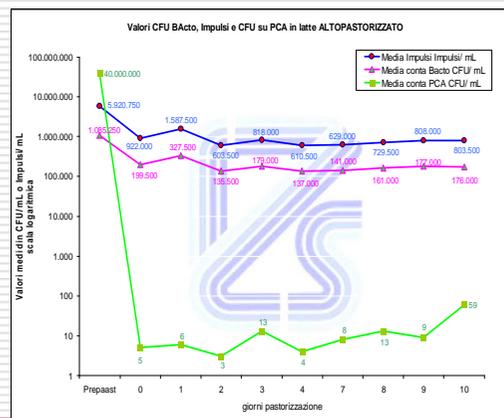
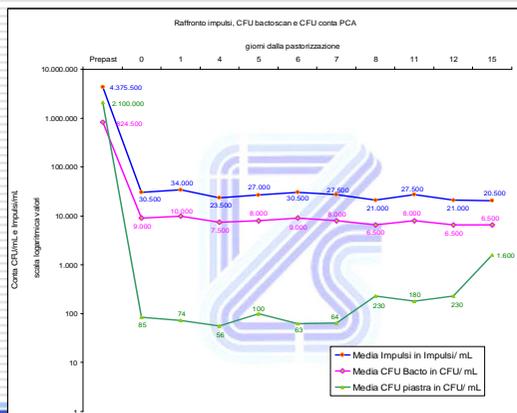
$$S_{yx} = 0,279$$



COSA STA FACENDO IL C.R.N.Q.L.B.

- Studio sul rapporto tra trattamento termico e colorabilità dei batteri
(Progetto di Ricerca Corrente finanziato da Min. Sanità)

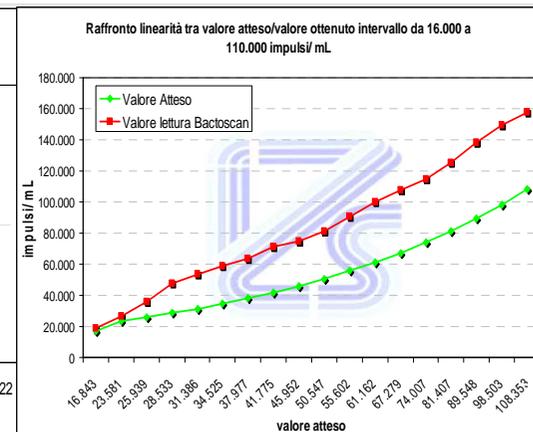
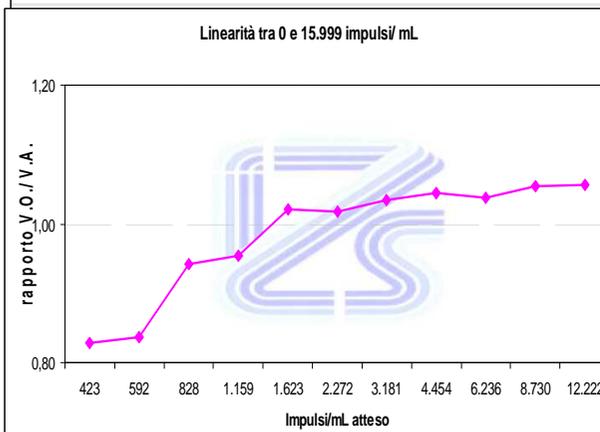
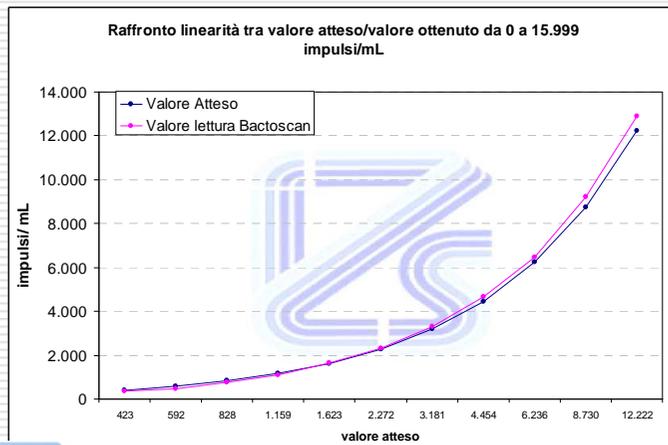
Da 25 anni sentiamo dire "si però il bactoscan conta i morti....."



COSA STA FACENDO IL C.R.N.Q.L.B

- Approfondimento sulla Linearità del Bactoscan
(Progetto di Ricerca Corrente finanziato da Min. Sanità)

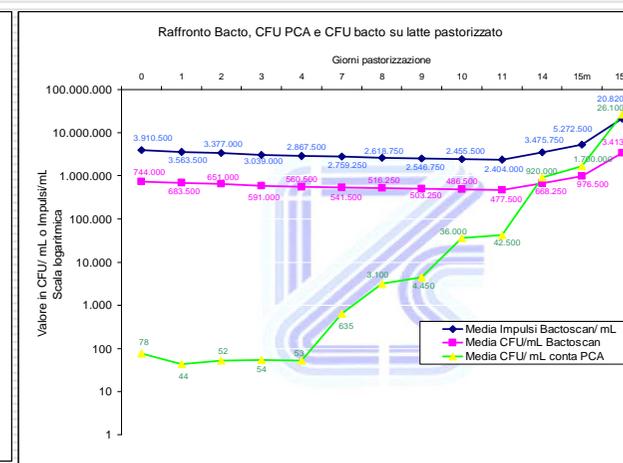
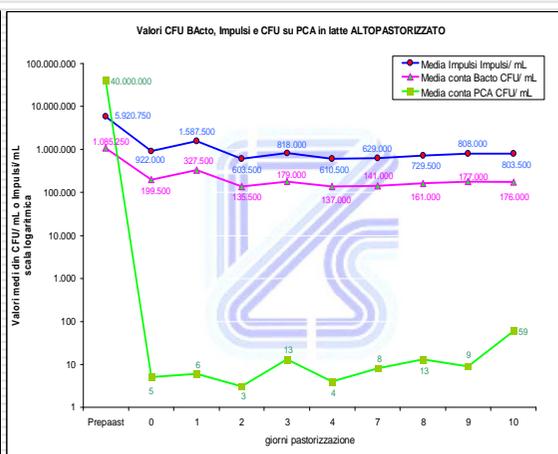
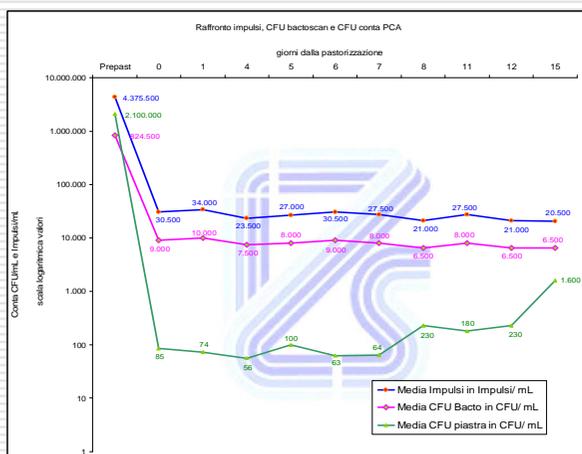
Farebbe comodo a tutti estendere la conversione comune oltre 50.000 Impulsi



COSA STA FACENDO IL C.R.N.Q.L.B. ■

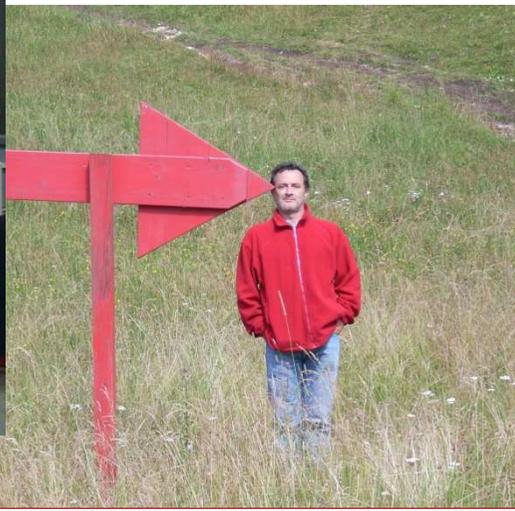
□ Studio dell'effetto del conservante sulla conversione

Sappiamo che il metodo di riferimento è "alterato" dai conservanti ma non sappiamo bene come



PROGETTO I.S.S. / IZSLER PER IL 2012

Sempre e solo la stessa cosa !!!!!!!



IL PROGETTO IZS – ISS in poche parole chiave un'opportunità per tutti

Irrobustire (Lab che hanno partecipato al lavoro originale)

Estendere (Lab che non hanno partecipato)

Ampliare (campo di applicazione)

Ufficializzare a livello Nazionale

Valorizzare a livello Europeo

“Condizionare” future Conversioni Comunitarie



passaparola

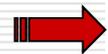
REGOLAMENTO (CE) N. 882/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO
E DEL CONSIGLIO
del 29 aprile 2004

relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare
la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti
e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali

(7) È pertanto opportuno definire a livello comunitario un quadro armonizzato di norme generali per l'organizzazione dei succitati controlli. È altresì opportuno valutare, alla luce dell'esperienza, se tale quadro generale funzioni correttamente, in particolare nel settore della salute e del benessere degli animali. È quindi opportuno che la Commissione presenti una relazione corredata, se del caso, delle proposte necessarie.

(18) La designazione di laboratori di riferimento comunitari e nazionali deve contribuire ad assicurare un'elevata qualità e uniformità dei risultati analitici. Tale obiettivo può essere raggiunto mediante attività quali l'applicazione di metodi analitici convalidati, l'assicurazione che siano disponibili materiali di riferimento, l'organizzazione di test comparativi e la formazione del personale di laboratorio.

LCR per alimenti e mangimi

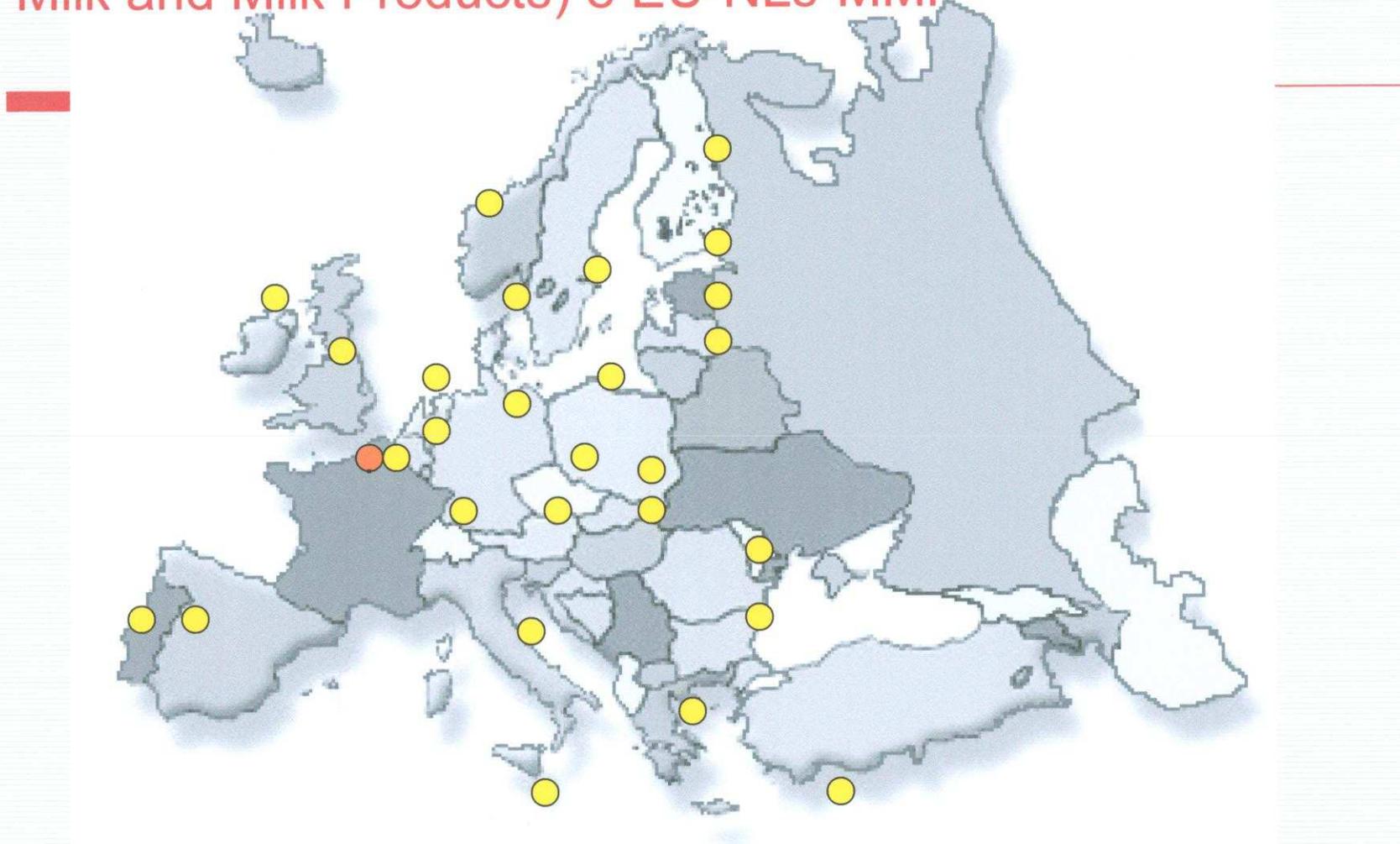


1. Latte e prodotti a base di latte
2. Zoonosi
3. Biotossine marine
4. Contaminazioni virali e batteriologiche dei molluschi bivalvi
5. *Listeria monocytogenes*
6. *Stafilococco coagulasi positivo*, compreso *S.aureus*
7. *E.coli*, compreso VTEC
8. *Campylobacter*
9. Parassiti (in particolare *trichinella*, *echinococcus* e *anisakis*)
10. Resistenza antimicrobica
11. Proteine nei mangimi
12. Residui di medicinali veterinari e contaminanti in alimenti di origine animale ALL 1
(Bilthoven, Fougères, Berlino, Roma)
13. Encefalopatie spongiformi trasmissibili
14. Additivi impiegati nell'alimentazione degli animali
15. OGM
16. Materiali destinati a venire a contatto con gli alimenti
17. Residui di pesticidi in cereali e mangimi
18. Residui di pesticidi in prodotti alimentari di origine animale e alimenti con alto contenuto di grassi
19. Residui di pesticidi in frutta e verdura, compresi alimenti con alto contenuto di acqua e acido
20. Residui di pesticidi – metodiche monoresiduo
21. Metalli pesanti in mangimi e alimenti
22. Micotossine
23. Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)
24. Diossine e PCB in mangimi e alimenti per animali

LCR per la salute degli animali e per gli animali vivi

1. Peste suina classica
2. Peste equina
3. Influenza aviaria
4. Malattia di Newcastle
5. Malattia vescicolare dei suini
6. Malattie dei pesci
7. Malattie dei molluschi bivalvi
8. Controllo dell'azione dei vaccini antirabbici
9. Febbre catarrale degli ovini
10. Peste suina africana
11. Zootecnia
12. Afta epizootica
13. Brucellosi
14. Malattie degli equini diverse dalla peste equina
15. Malattie dei crostacei
16. Rabbia

EU-RL-MMP (European Union Reference Laboratory for Milk and Milk Products) e EU-NLs-MMP



REGOLAMENTO (CE) n. 1664/2006 DELLA COMMISSIONE

del 6 novembre 2006

che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 per quanto riguarda le misure di attuazione per taluni prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che abroga talune misure di attuazione

DETERMINAZIONE DELLA CONTA BATTERICA MICROBICA E CONTA DELLE CELLULE SOMATICHE

1. Per la verifica dei criteri di cui all'allegato III, sezione IX, capitolo I, parte III del regolamento (CE) n. 853/2004 vanno applicate come metodi di riferimento le seguenti norme:

a) EN/ISO 4833 per la conta delle colonie a 30 °C;

b) ISO 13366-1 per la conta delle cellule somatiche.

2. È accettabile l'impiego di metodi analitici alternativi:

a) per la conta delle colonie a 30 °C, qualora i metodi siano convalidati in base al metodo di riferimento di cui al punto 1, lettera a), conformemente al protocollo stabilito dalla norma EN/ISO 16140 od ad altri protocolli simili riconosciuti a livello internazionale.

In particolare, il rapporto di conversione tra un metodo alternativo e il metodo di riferimento di cui al punto 1, lettera a), è stabilito conformemente alla norma ISO 21187;

b) per la conta delle cellule somatiche, qualora i metodi siano convalidati in base al metodo di riferimento di cui al punto 1, lettera b), conformemente al protocollo stabilito dalla norma ISO 8196, e impiegati conformemente alla norma ISO 13366-2 od altri protocolli simili riconosciuti a livello internazionale.

...però

- a tutt'oggi nessuno dei metodi alternativi per la determinazione della flora totale nel latte crudo è stato completamente validato secondo EN ISO 16140

- un motivo è che la norma EN ISO 16140 Standard non è perfettamente adatta alla validazione dei metodi alternativi per la determinazione della flora totale nel latte.
 - la validazione di un metodo alternativo richiede la valutazione dell'equivalenza tra il metodo alternativo ed il metodo di riferimento. questo può risultare difficile perché il target analitico non coincide perfettamente: il metodo strumentale conta cellule singole (anche quelle non in grado di moltiplicarsi), mentre EN ISO 4833 conta unità formanti colonie (UFC).

Decisione a livello EU-RL-MMP

- Conclusioni del 13° workshop dei Laboratori Nazionali di Riferimento per il latte e i prodotti a base di latte (NRLs MMP) dedicato alla flora totale nel latte crudo (2010, Maisons-Alfort; Francia):
 - i metodi alternativi per la conta della flora totale nel latte crudo devono essere vengano validati da enti terzi secondo il protocollo EN ISO 16140 nell'arco di 2 anni
 - dovrebbe essere definita una retta di conversione/tipo di strumento/ paese
 - Il EU-RL for milk and milk products si fa carico della preparazione di un documento per criteri di validazione che combinino la EN ISO 16140 con la draft revision IDF 161 (ISO/DIS 16297, 2010) e in alcuni casi, la IDF 128-3/ISO 8196-3

Decisione a livello EU-RL for milk and milk products

- EN ISO 16140 standard: Microbiology of food and animal feeding stuffs-Protocol for the validation of alternative methods
- Draft revision IDF 161 standard (ISO/DIS 16297): Milk- bacterial count. Protocol for the evaluation of alternative methods
- IDF 128.3 standard (ISO 8196-3): Milk –definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis. Part 3: protocol for the evaluation and validation of alternative quantitative methods of milk analysis

Criteria for the validation of alternative methods for the determination of total flora in raw milk

Protocol for validation (EN ISO 16140)

Two phases:

□ comparison of methods:

evaluation of the performances of the alternative method compared to the reference method

Limits of quantification, Linearity, Carry-over effect, Stability, Reproducibility intra-laboratory, Critical factors; Estimation of the accuracy of the alternative method compared to the reference method

➡ The acceptability's value for S_r is: maximum of $0,12 \log_{10}$ (tentative value).

➡ The acceptability value for the standard deviation of accuracy $S_{y,x}$ is: maximum of $0,4 \log_{10}$ (tentative value).

□ inter-laboratory study of each of the two methods

Estimation of the accuracy and precision of the alternative method compared to the reference method

Progetto per la unificazione della retta di conversione a livello europeo. Come realizzarlo?

- Modello lineare ad effetti misti:
 - La relazione tra IBC Bactoscan FC e UFC è l'effetto fisso da indagare (stima dei parametri della retta di regressione comune)
 - I diversi laboratori costituiscono un campione delle possibili n unità sperimentali in grado di stimare la relazione, rappresentando quindi una componente casuale di variabilità (effetto random)
 - Possibilità di determinare l'impatto del paese di origine (random effect)

Invito alla partecipazione al progetto attraverso la raccolta dati per l'aggiornamento dell'equazione di conversione...

TUTO SUPERIORE DI SANITA'

I.S.S. - S.V.S.A.
SVA 19/07/2011-0000955
Documento Interno 1

Prot. ISS /SVSA-AL.22
Risposta al foglio del n. //
Allegati: scheda di partecipazione
scheda raccolta dati

A tutti i responsabili dei laboratori di controllo della carica microbica del latte. LORO SEDI

Oggetto: raccolta dati per l'aggiornamento dell'equazione di conversione

Egregio Collega,

Il Laboratorio Nazionale di Riferimento in materia di analisi e di prove sul latte e sui prodotti a base di latte (LNR-ISS) intende avviare per il 2011 una serie di iniziative conseguenti alle attività previste dal Laboratorio Comunitario per il latte di Maisons-Alfort.

Tra le priorità definite dal LRC è stata individuata la problematica relativa alla definizione di una retta di conversione unificata a livello comunitario per la determinazione della carica batterica nel latte (metodo di riferimento EN ISO 4833) tramite conversione dei dati ottenuti da metodo alternativo optofluorimetrico (Bactoscan/Bactocount), come indicato dal Reg 1664/2006.

A livello nazionale sono attualmente disponibili i risultati di un lavoro (2009) del Centro di Riferenza Nazionale per la qualità del latte bovino dell' IZSLER, che ha portato alla proposta di una modalità unica nazionale di conversione.

In vista della trasmissione dei dati nazionali al LCR, al fine di garantire la più ampia rappresentatività della realtà italiana, il Laboratorio Nazionale di Riferimento per il latte e i prodotti a base di latte, prima di confermare la proposta sopra citata come unica rappresentante della più recente realtà nazionale, intende verificare se sia possibile aggiornare i dati del succitato lavoro.

Pertanto il LNR-ISS invita tutti i laboratori che utilizzano strumenti optofluorimetrici per la determinazione della carica batterica del latte crudo (bovino, ovicaprino, bufalino) a trasmettere informazioni e risultati ottenuti nel corso di prove eseguite in proprio negli ultimi 5 anni per la validazione della modalità di conversione (vedi scheda allegata) entro il 30 ottobre 2011. I laboratori che invece non avessero dati già disponibili ma avessero intenzione di produrne appositamente, potranno invece inviarli entro il 30 aprile 2012.

1 di 2

TUTO SUPERIORE DI SANITA'

Il presente invito viene esteso anche ai Laboratori che hanno già partecipato al Progetto IZSLER, nel caso abbiano realizzato prove aggiuntive di consolidamento.

Si richiede altresì la disponibilità ad eseguire ulteriori prove di approfondimento/aggiornamento secondo un protocollo operativo che verrà definito e concordato con i Centri di Riferenza Nazionali degli IZS interessati (Brescia e Roma) e con i Laboratori partecipanti.

I risultati elaborati verranno comunicati anticipatamente a ciascun partecipante e presentati in occasione di una giornata di incontro che si prevede di tenere in ISS alla fine della elaborazione.

A scopo organizzativo si richiede cortesemente di compilare e rispedire la scheda di partecipazione allegata entro il 15 settembre 2011 all'indirizzo seguente: annamaria.ferrini@iss.it
Per qualsiasi informazione, non esitate a contattarci.
Cordialmente

Umberto AGRIMI
Direttore
Dip SPVSA

Paolo AURELI
Responsabile
LNR Latte

2 di 2

Selezione dei campioni in funzione della contaminazione... e quanti

INTERVALLO IMPULSI	% sul totale dei campioni
0-20	3
21- 100	30
100-1000	30
1000-5000	25
5000-10000	4
10000-50000	4
50000- 99999	4

progetto ISS - IZS.LER - IZS.LT



□ tempistica

luglio 2011	invio lettere di invito alla partecipazione al progetto	n° 56
ottobre 2011	raccolta schede adesioni	24
giugno 2012	invio risultati	
settembre 2012	elaborazione dati	
ottobre 2012	report finale	

SCHEDA DI PARTECIPAZIONE

si prega di compilare e rimandare per e-mail all'indirizzo : annamaria.ferrini@iss.it

Nome laboratorio	
Indirizzo completo del laboratorio	
Nominativo per eventuali contatti	
Recapito tel.	
Recapito fax/ mail	
Il Laboratorio si rende disponibile ad inviare dati analitici ottenuti nel corso di prove di validazione della conversione	
il laboratorio intende partecipare al progetto di realizzazione di prove di aggiornamento/approfondimento	
se no, specificare il motivo	
data	
firma	

entro il 15 settembre 2011

contiamo sulla vostra partecipazione!

grazie per l'attenzione

annamaria.ferrini@iss.it