

METODI ALTERNATIVI PER LA VALUTAZIONE DELLA FLORA TOTALE NEL LATTE CRUDO: CONSIDERAZIONI E CRITERI DI VALIDAZIONE

Anna Maria Ferrini
LNR per il latte e i prodotti a base di latte

riunione tecnica a chiusura del progetto:

Aggiornamento dell'equazione di conversione per la determinazione della carica batterica nel latte tramite apparecchiature automatiche operanti in citometria di flusso: "conversione nazionale Bactoscan FC - anno 2012"



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

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;

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;

Metodi alternativi per la valutazione della flora totale nel latte crudo: considerazioni e criteri di validazione ISS 30.04.2013



Metodo di riferimento

definizione secondo EN ISO 16140:

internationally recognized method and widely accepted

I metodi di riferimento in microbiologia degli alimenti sono standardizzati a livello internazionale (ISO) ed europeo (CEN) e sono principalmente basati sulla microbiologia convenzionale

- ➔ massima applicabilità nella microbiologia degli alimenti a livello internazionale
- ➔ massimo consenso



Metodo Alternativo

definizione secondo EN ISO 16140:

method of analysis that demonstrates or estimates, for a given category of products, the same analyte as is measured using the corresponding reference method

The alternative method exhibits attributes appropriate to the users' needs, for example: speed of analysis and/or response; ease of execution and/or automation; analytical properties (precision, accuracy, limit of detection, etc.); miniaturisation; reduction of cost.



Conta Batterica Totale (UFC/ml)

METODO DI RIFERIMENTO EN ISO 4833

- Singole cellule batteriche o singoli aggregati in grado di sviluppare **colonie** in opportune condizioni
- Risultato espresso in **UFC/ml**
- Tempo di risposta : ~ **72 h**

METODO DI ROUTINE (Metodo a citometria di flusso - Bactoscan FC/ Bactocount)

- Aggregati batterici “disaggregati” in **cellule singole**, citometria di flusso, conversione fascio di luce in impulsi elettronici
- Risultato espresso in **IBC/ μ l**
- Tempo di risposta: ~ **10 min**



avanzamento sull'armonizzazione dei fattori di conversione per la valutazione della CBT

Kiel 2006

- Richiesta del LCR milk ad ogni paese di elaborare una propria retta di conversione nazionale

- ISO 21187 : 2004

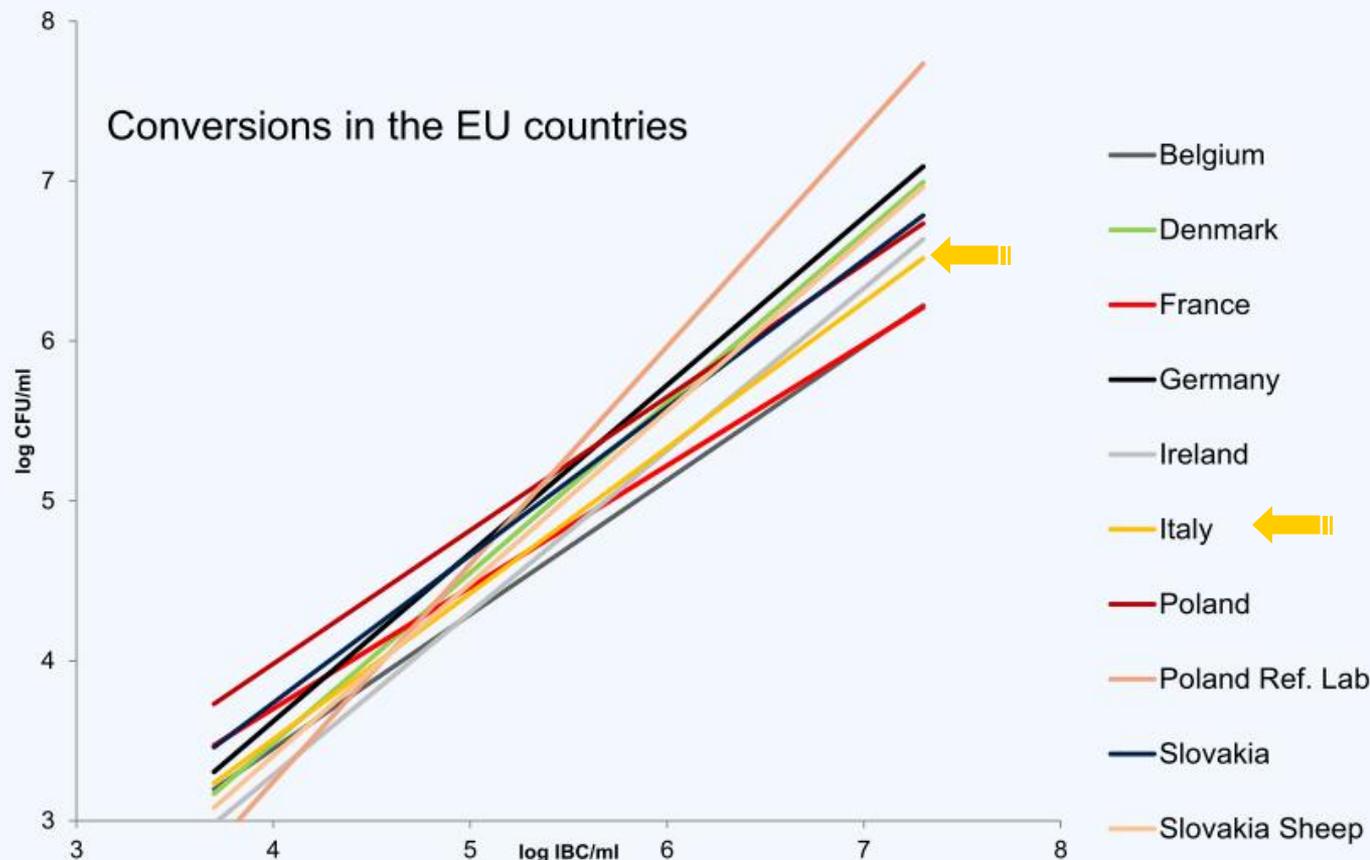
Milk: Quantitative determination of bacteriological quality- Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method and anchor method results



avanzamento sull'armonizzazione dei fattori di conversione per la valutazione della CBT

Conversions in the EU countries (1)

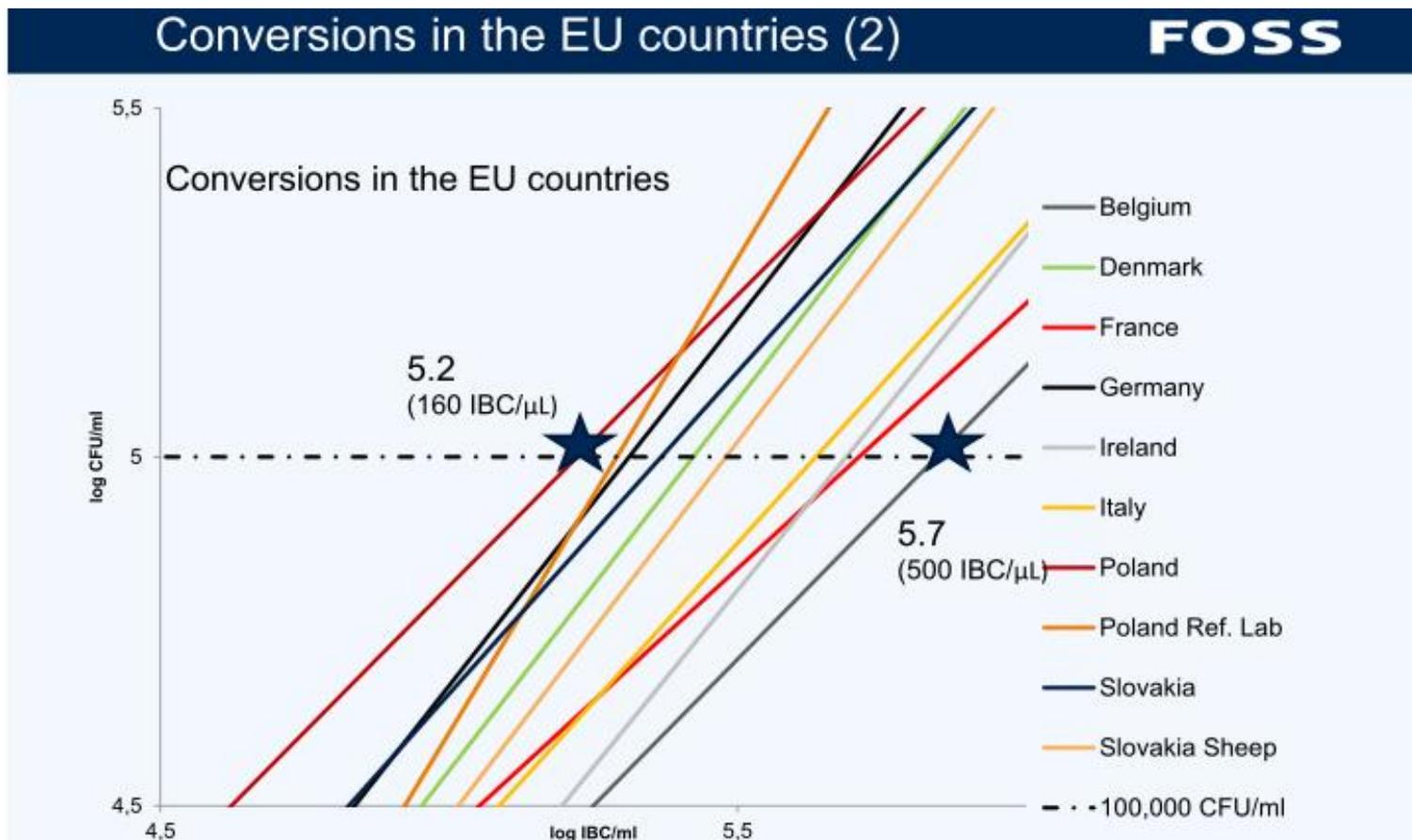
FOSS



Metodi alternativi per la valutazione della flora totale nel latte crudo: considerazioni e criteri di validazione ISS 30.04.2013



avanzamento sull'armonizzazione dei fattori di conversione per la valutazione della CBT



Metodi alternativi per la valutazione della flora totale nel latte crudo: considerazioni e criteri di validazione ISS 30.04.2013



avanzamento sull'armonizzazione dei fattori di conversione per la valutazione della CBT

Maisons-Alfort 2010

- Singola retta di conversione/tipo di strumento/paese
- Validazione dei metodi alternativi per la conta della flora totale nel latte crudo secondo il protocollo **EN ISO 16140**
- Preparazione di un documento da parte di EU-RL for milk and milk products per **criteri di validazione** per combinare EN ISO 16140, EN ISO 21187, draft revision IDF 161 (ISO/DIS 16297, 2010) e in alcuni casi, IDF 128-3/ISO 8196-3



EN ISO
16140

ISO/DIS
16297

ISO 8196-3

Max*/tentative
value

PARAMETRI DI VALIDAZIONE DEL METODO ALTERNATIVO

Lim quantificazione inf

x

Lim quantificazione sup

x

Linearità

x

calcolo

x

Carry over

x

protocollo

x

Stabilità

x

Precisione:

ripetibilità intralab

x

*Sr: 0,12 log₁₀

riproducibilità (Studio interlaboratorio)

x

*SR: 0,16 log₁₀

Valutazione dei fattori che impattano sui risultati

x

Accuratezza

x

Sy,x: 0,40 log₁₀

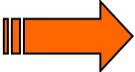
Metodi alternativi per la valutazione della flora totale nel latte crudo: considerazioni e criteri di validazione ISS 30.04.2013



Protocollo per la validazione (EN ISO 16140)

*Nello specifico, per la determinazione della flora totale con citometria di flusso occorre che i laboratori partecipanti producano **risultati comparabili***

due opzioni:

-  *i laboratori partecipanti utilizzano il fattore di conversione stabilito dall'organizzatore*
-  *i laboratori partecipanti inviano all'organizzatore i dati grezzi (espressi in unità del citofluorimetro) che vengono poi trasformati in UFC/ml dall'organizzatore*



avanzamento sull'armonizzazione dei fattori di conversione per la valutazione della CBT

Maisons - Alfort 2011

- Verifica della possibilità di armonizzare i fattori di conversione a **livello europeo**
- Analisi dei **dati grezzi ottenuti dai diversi LRN**



Protocollo per la validazione (EN ISO 16140)

definizione secondo EN ISO 16140:

- ***Demonstration that adequate confidence is provided that the results obtained by the alternative method are comparable to those obtained using the reference method***

Due fasi:

- **Studio comparativo dei metodi (MA vs MR)**
- **studio inter-laboratorio sui due metodi in parallelo**

Stima dell'accuratezza e precisione del metodo alternativo rispetto al metodo di riferimento (EN ISO 16140)



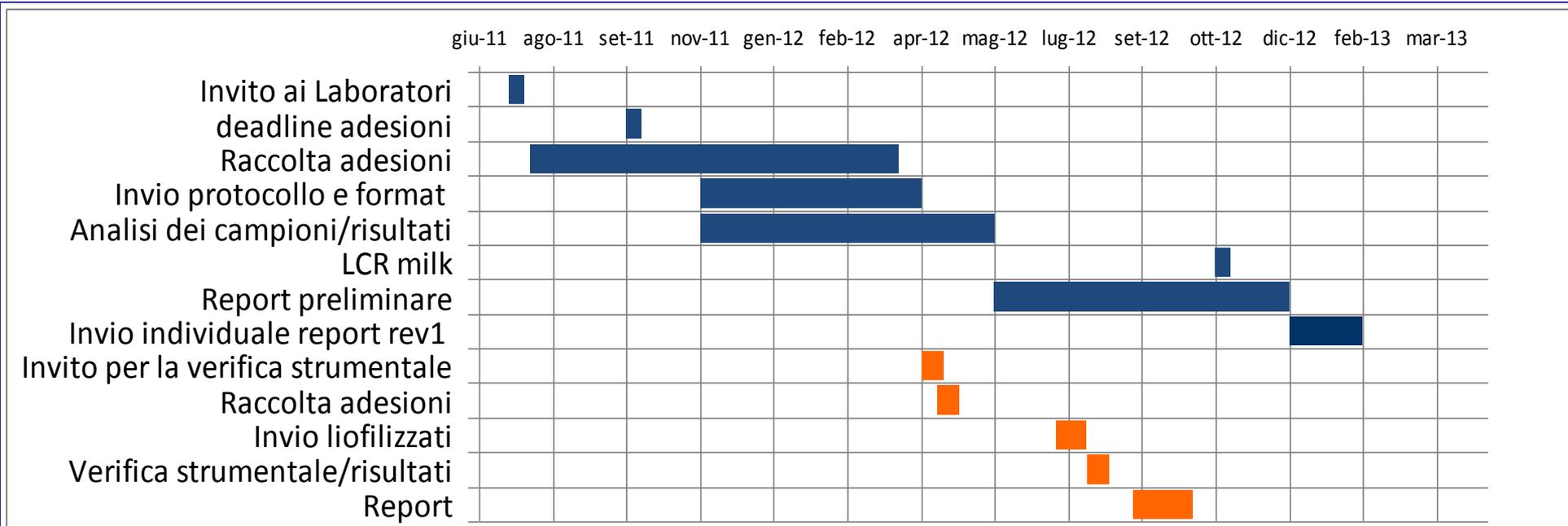
Obiettivi progetto conversione nazionale Bactoscan FC - anno 2012

Produrre una **retta unica di conversione nazionale**
statisticamente sostenibile, rappresentativa
dell'intero territorio nazionale e aggiornata

Produrre dati in previsione della produzione della
conversione unica europea



Progetto “conversione nazionale Bactoscan FC – 2011- 2012”



Metodi alternativi per la valutazione della flora totale nel latte crudo: considerazioni e criteri di validazione ISS 30.04.2013



RANGES OF IBC/ml richiesti per la selezione dei campioni

| IBC ranges | Lab 2011 | Lab circuiti 2009 e 2011 |
|--------------|---|---|
| | % di campioni sul n° totale di campioni 50 -100 campioni | % di campioni sul n° totale di campioni 20 - 50 campioni |
| 0-20 | 3 | 3 |
| 21- 100 | 30 | 10 |
| 100-1000 | 30 | 10 |
| 1000-5000 | 25 | 10 |
| 5000-10000 | 4 | 30 |
| 10000-50000 | 4 | 27 |
| 50000- 99999 | 4 | 10 |

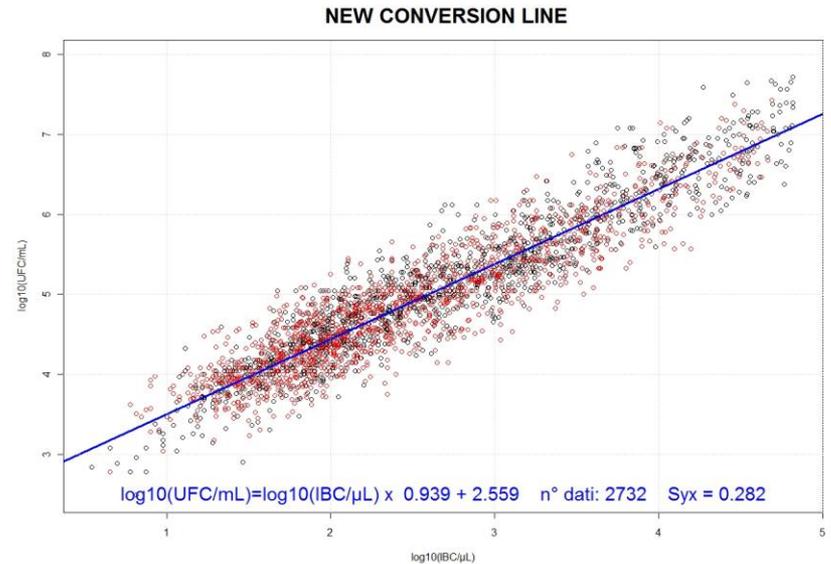


Obiettivo raggiunto:

- Produzione di una retta unica di conversione per l'Italia

elaborazione complessiva (2.732 dati)

rappresentatività del territorio nazionale



conclusione:

Passaggio alla nuova retta di conversione nazionale 2012 (retta unica per l'Italia)





Grazie per l'attenzione

annamaria.ferrini@iss.it

