



Istituto Superiore di Sanità
Dip. Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Laboratorio Nazionale di Riferimento per il latte e i
prodotti a base di latte

IZS del Lazio e della Toscana
“M. Aleandri”
Centro di Riferenza Nazionale per la Qualità del latte e dei
Prodotti Derivati degli Ovini e dei Caprini
(C.Re.L.D.O.C.)

Report finale rev. 0

**Aggiornamento delle equazioni di conversione per la determinazione
della carica batterica in latte ovino e caprino
tramite apparecchiature automatiche operanti in citometria di flusso**

data emissione: 01.03.2016

INTRODUZIONE

Di seguito vengono riportati i risultati di due studi che hanno permesso le elaborazioni delle equazioni di conversione per la determinazione della carica batterica totale a 30 °C (CBT) nel latte ovino e rispettivamente nel latte caprino tramite apparecchiature automatiche operanti in citometria di flusso, nello specifico Bactoscan FC.

La scelta di presentarli in un unico report è dovuta al fatto che i due studi sono “gemelli” cioè avviati e conclusi nello stesso periodo di tempo e realizzati seguendo un identico protocollo analitico.

Il lavoro è il prosieguo del percorso di armonizzazione e aggiornamento delle rette di conversione per la determinazione della carica batterica nel latte avviata nel 2011 dal LNR per il latte (ISS) in collaborazione con i Centri di Referenza Nazionali per la qualità del latte e dei prodotti derivati degli ovini e dei caprini (C.Re.L.D.O.C.) e rispettivamente per la Qualità del Latte Bovino (CRNQLB).

La definizione delle rette di conversione è fortemente stimolata dall’EURL-MMP che incoraggia i NRL-MMP di tutti paesi membri alla elaborazione di singole rette nazionali per ciascun tipo di strumento e specie animale.

In Italia questo è già stato fatto relativamente al latte bovino al seguito dello studio collaborativo LNR latte –CRNQLB concluso nel 2013 mentre il presente report, frutto della collaborazione tra LNR latte - C.Re.L.D.O.C., presenta i dati delle nuove rette nazionali di conversione per la determinazione della carica batterica totale con citometria di flusso nel latte ovino e caprino.

In Italia il latte ovino viene destinato esclusivamente alla caseificazione ed è al secondo posto, dopo il latte vaccino, come quantitativo utilizzato per la produzione di formaggio (dati ISTAT 2014 : 368.643 tonnellate). Anche il latte caprino viene destinato alla caseificazione per quanto, da qualche anno si sta assistendo ad una domanda crescente di latte alimentare - soprattutto come alternativa al latte vaccino, in particolare nella prima infanzia.

Per il latte di entrambe le specie, relativamente alla carica batterica totale valgono i seguenti criteri stabiliti dal Reg CE 853/04:

$\leq 1.500.000$ UFC/ml per latte destinato alla produzione di formaggi a latte pastorizzato

≤ 500.000 UFC/ml per latte destinato alla produzione di prodotti al latte crudo (entrambi i valori sono calcolati come medie geometriche mobili, su un periodo di due mesi, con almeno due prelievi al mese).

Dal volume totale di latte prodotto per le due specie in Italia e dalla frequenza dei controlli per il tenore di germi a 30 °C/ml (CBT) richiesti, si evidenzia l’importanza e l’utilità di disporre di rette di

conversione specifiche che permettano di ridurre sensibilmente i tempi di analisi e al contempo assicurare precisione e accuratezza dei risultati.

Entrambi gli studi sono stati avviati nel 2013 e sono stati condotti su campioni raccolti durante tutto l'arco della lattazione degli animali per cercare di comprendere le eventuali influenze stagionali e quelle derivanti dalle diverse tipologie di conduzione dell'allevamento. Riteniamo pertanto di aver ottenuto un campionamento sufficientemente rappresentativo della realtà produttiva italiana del latte ovino e del latte caprino.

Per lo stesso motivo, le numerosità dei campioni da analizzare per le diverse fasce di contaminazione indicate ai laboratori partecipanti, sono state proposte tenendo conto sia della contaminazione naturale di entrambe le specie di latte, sia dei limiti stabiliti dal Reg EU 853/04.

In considerazione dell'elevato numero di cellule somatiche presente in media nei campioni di latte di massa ovi-caprini si è indagato infine sul possibile effetto che queste possono avere sul valore degli impulsi.

Le rette di conversione per la determinazione della CBT nel latte ovino e caprino presentate in questo report sono di immediato utilizzo per i laboratori che hanno partecipato a questo progetto.

Si ricorda tuttavia ad altri laboratori che non abbiano partecipato e che eventualmente determinassero il parametro della conta batterica nel latte ovino utilizzando il Bactoscan, che sono ugualmente invitati ad implementare la retta verificando preliminarmente la rispondenza con dati prodotti nel laboratorio.

Si ringraziano tutti i partecipanti che, con il loro prezioso contributo individuale, hanno reso possibile la realizzazione di questo nuovo lavoro di grande importanza per l'intero settore lattiero caseario.

LABORATORI PARTECIPANTI

| Laboratorio | Città | Circuito ovino | Circuito caprino |
|--------------------------------------|---------------|----------------|------------------|
| A. A. F. V.G. | Codroipo (UD) | x | x |
| A. R. A. Sardegna | Oristano | x | x |
| Centro Agrochimico Regionale ASSAM | Jesi (AN) | x | x |
| CONCAST TARENTINGRANA | 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 | - |

PROTOCOLLO

Ogni laboratorio ha analizzato durante gli anni 2013-2015, campioni di latte di massa, con due metodi: metodo di riferimento (ISO 4833-1:2013) e metodo di routine attraverso BactoscanFC (BFC) .

Il protocollo ha previsto le seguenti indicazioni:

- Utilizzo di campioni di latte di massa **senza conservante**
- Conservazione dei campioni a **+4°C ±2** 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 preriscaldamento:
 - Misura degli IBC/μl al Bactoscan FC **in condizioni di ripetibilità** e in rapida successione
 - Determinazione della carica batterica totale **entro 10 minuti** e in condizioni di **ripetibilità** con il metodo di riferimento (ISO 4833-1:2013) utilizzando **2 piastre per ogni diluizione**
- Registrazione dei dati grezzi su fogli Excel appositamente predisposti

Determinazione del numero dei campioni da analizzare

Come già detto 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.

Il numero dei campioni analizzati deve pertanto essere sufficiente a rappresentare le variazioni che possono derivare dai fattori su esposti.

La norma stabilisce, considerando una regressione lineare, che il numero dei campioni di prova necessari può essere calcolato tramite la seguente equazione:

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

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

δ = valore dell'errore relativo alla regressione da stimare (*δ*=0,1 è considerato appropriato dalla norma)

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

Nel caso in cui il coefficiente di correlazione sia sottostimato è necessario inserire nei calcoli un numero maggiore di prove.

Per entrambi gli studi il numero dei campioni utilizzati è risultato idoneo rispetto a quanto previsto dalla norma.

BASE DATI

Il progetto sul latte ovino si è svolto con la partecipazione di 6 laboratori per un totale di 144 campioni. L'elaborazione precedente era stata realizzata nel 2012 con la partecipazione di 5 laboratori ed un totale di 340 campioni. Per ottimizzare la retta di conversione del 2015, si è ritenuto quindi di procedere ad una elaborazione complessiva utilizzando i dati disponibili raccolti nel periodo 2012-2015 provenienti da 11 laboratori per complessivi 484 campioni.

Il progetto sul latte caprino è stato eseguito unendo i dati derivati da 8 laboratori che complessivamente hanno eseguito le prove di comparazione su 638 campioni.

Tab. 1 - Circuito ovi-caprino 2012-2015

| | Anno 2012 | Anno 2015 | totale |
|--------------------------------|-----------|-----------|--------|
| <i>Circuito ovino</i> | | | |
| laboratori | 5 | 6 | 11 |
| campioni | 340 | 144 | 484 |
| <i>Circuito caprino</i> | | | |
| laboratori | | | 8 |
| campioni | | | 638 |

VERIFICHE STRUMENTALI PRELIMINARI

Linearità strumentale

La linearità strumentale è stata verificata in base alla ISO 16297:2013 – IDF 161:2013.

Da un campione di latte con un numero di impulsi >50.000 IBC*/ μ L, sono state allestite 17 diluizioni seriali che hanno coperto l'intero range dei conteggi di interesse.

Sono state eseguite 5 letture per ogni campione, e calcolata la media. Nel grafico in Fig 1, in ordinata sono riportate le medie delle 5 letture di ogni campione e in ascissa i rispettivi valori attesi.

E' stata quindi calcolata la regressione tra i risultati ottenuti dalle letture e quelli corrispondenti calcolati in relazione alle diluizioni eseguite.

La relazione tra valore misurato degli impulsi e valore atteso è risultata elevata fino al valore di 50.000 IBC/ μ L, come dimostrato anche da precedenti lavori eseguiti sul latte bovino.

E' stata calcolata poi la relazione rL che esprime il rapporto tra la differenza dei valori massimo e minimo dei residui della regressione ($\Delta C_{max} - \Delta C_{min}$) e la differenza tra i valori medi misurati rispettivamente per la concentrazione massima e minima ($C_{meas, max} - C_{meas, min}$) dell'intervallo studiato:

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

I valori ottenuti rispettivamente per il latte ovino e caprino sono risultati pari al 4,35% e al 4,6% e conformi al requisito di norma: <5%.

*IBC = Impulsi Bactoscan

Fig. 1 - Diagramma di dispersione e retta di regressione tra Valore atteso IBC/ μ L e Valore misurato IBC/ μ L

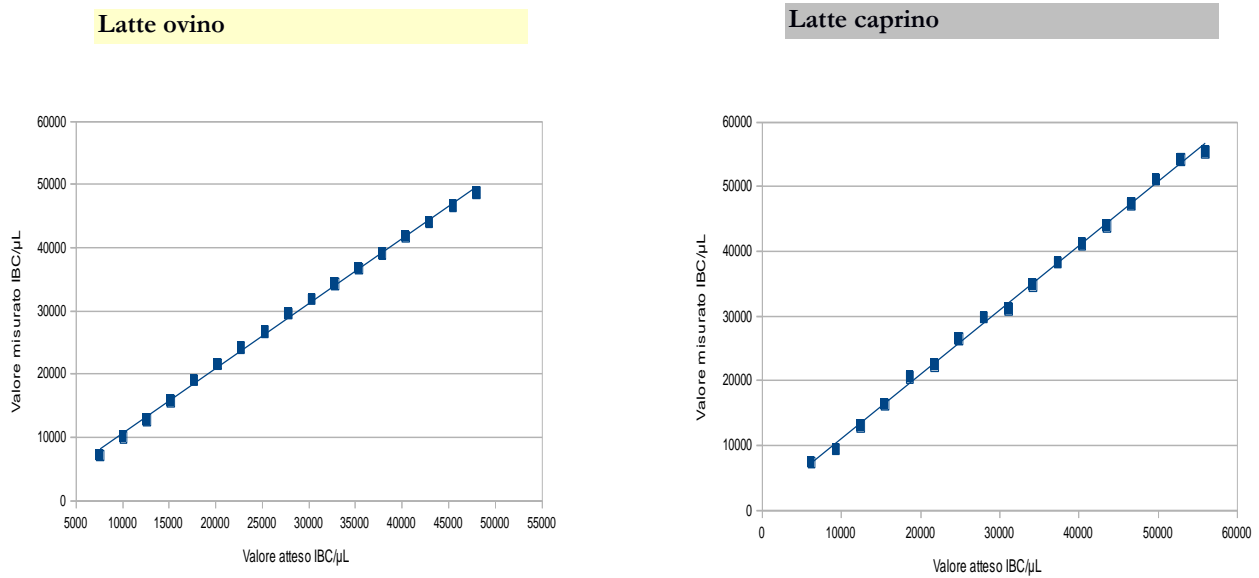
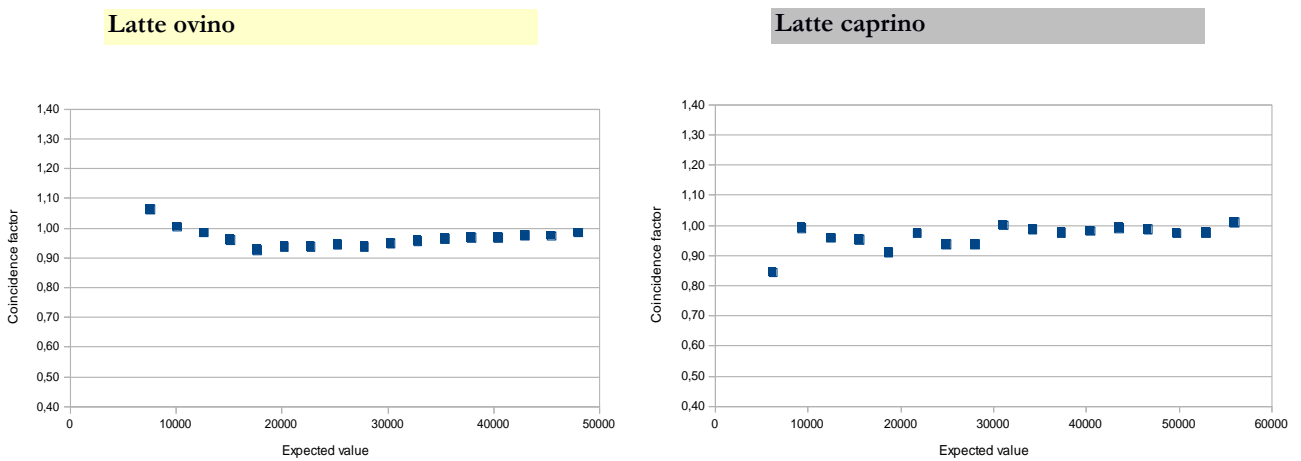


Fig.2 - Diagramma Fattore di coincidenza



Campo di misura dello strumento Bactoscan FC

In base alla verifica dei dati precedenti si è ritenuto corretto utilizzare il Bactoscan FC nel range 10-50.000 IBC/ μ L.

SELEZIONE DEI DATI

1. Ripetibilità dei conteggi strumentali (BFC) (Prova in doppio)

La ripetibilità ottenuta dai conteggi strumentali nell'analisi dei singoli campioni è stata valutata rispetto ai limiti di ripetibilità previsti per per BactoscanFC a diversi ranges di IBC/ μ L.

Tab. 2 - Scarto tipo di ripetibilità del BactoscanFC a diversi ranges di IBC/ μ L

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

Criterio di esclusione: differenza tra i due valori del campione analizzato in doppio $> 2.83 \times$ Sr (log) del BactoscanFC presa come riferimento.

2. Accettabilità dei risultati del metodo di riferimento (ISO 4833-1:2013)

2.1 Verifica della proporzionalità dei conteggi

I risultati dei conteggi delle piastre effettuate con il metodo di riferimento e con un numero di colonie compreso tra 10 e 300, sono stati sottoposti a verifica del grado di accordo con il modello di distribuzione teorica.

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

La linearità è stata valutata utilizzando la seguente formula (3):

| | |
|-------|--|
| c_i | <i>Numero delle colonie rilevate nella piastra</i> |
| R_i | <i>Quantità relativa di campione inoculata alla diluizione in esame.</i> |

I risultati sono proporzionali se la seguente espressione risulta soddisfatta:

$$G_{m-1}^2 \leq \chi_{g.l}^2 \quad \text{con g. l.} = n^\circ \text{ diluizioni esaminate} - 1$$

Per la valutazione della dispersione dei risultati ottenuti nelle repliche della stessa diluizione è stato calcolato il valore di K_p

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

C_1 e C_2 = Valore dei conteggi nelle due repliche

Si riportano di seguito i criteri di accettabilità della dispersione dei dati in funzione del valore di K_p

| | |
|---------------------------|---------------------------|
| $K_p < 1,96$: | dispersione accettabile |
| $1,96 < K_p \leq 2,576$: | dispersione critica |
| $K_p > 2,576$: | dispersione inaccettabile |

I campioni con valori critici e inaccettabili non sono stati inseriti nel calcolo della regressione.

2.2 Verifica della ripetibilità - Prova in doppio

Sono stati esaminati i risultati delle prove in doppio eseguite per ogni campione.

Il metodo ISO 4833:2003, prevede un limite di ripetibilità $r = 0,25 \log_{10}$, pari al rapporto di 1,8 in scala numerica normale.

E' stato effettuato quindi il confronto dei risultati ottenuti dalle prove in doppio in base a questo limite.

2.3 Dati eliminati

Considerando il campo di misura adottato e i controlli menzionati ai punti 1 e 2, sono stati eliminati i risultati derivanti da 19 campioni di latte per il circuito ovino e 37 per il circuito caprino.

CALCOLO DELLA CONVERSIONE

In base a quanto specificato dalla ISO 21187:2004, per il calcolo della relazione fra i due metodi, si è applicato un modello di regressione lineare.

Per il calcolo della regressione lineare si è considerato come variabile dipendente (Y) il metodo di riferimento, espresso in UFC/ml e come variabile indipendente (X) il metodo di routine in validazione, espresso in IBC/ml. Questa scelta è prevista dalla ISO 21187 in considerazione del maggiore errore di ripetibilità del metodo di riferimento.

La relazione per il calcolo dei valori UFC stimati dal metodo di routine è:

$$\text{Log}_{10} \text{UFC} = a + b \cdot \text{Log}_{10} \text{IBC}$$

a = intercetta della retta di regressione

b = coefficiente angolare della retta di regressione

IBC = Impulsi apparecchiatura

Outliers

Le medie dei risultati ottenuti sono stati analizzati per la verifica della presenza di outliers. Sono stati eliminati i campioni che evidenziavano uno scarto standardizzato $> |2,58|$.

Gli outliers sono stati scartati e la regressione è stata ricalcolata.

In seguito a questo processo sono stati eliminati i risultati di 8 campioni per l'ovino e di 20 campioni per il caprino.

INTERVALLO DI CONFIDENZA DELLA STIMA

In base a quanto ISO 16140 i limiti di confidenza per il valore stimato in UFC a partire da un punto "X" di BFC (metodo di routine) è espresso dalla relazione:

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

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

t = t di Student per un livello di confidenza α e $N-2$ gradi di libertà

N = numero di campioni utilizzati per stimare la regressione

V_x = varianza dei valori di x (metodo di routine, IBC) utilizzati per la stima della retta di regressione

$S_{y:x}$ = errore residuo della regressione

La formula si può semplificare in quanto per un numero elevato di campioni il II e III membro sotto radice diventano trascurabili (t tende a 1,96 per $p=95\%$):

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

($S_{y:x}$ = deviazione standard residua per i punti stimati dalla regressione)

RISULTATI

Distribuzione dei campioni

Nella seguente tabella sono descritte le distribuzioni percentuali dei 457 campioni di latte ovino (da un totale di 484) e dei 581 campioni (da un totale di 638) di latte caprino che sono stati utilizzati per l'elaborazione della retta di regressione:

Tab.3 – Distribuzione dei campioni analizzati in classi di IBC

| Classi di impulsi Bactoscan IBC/ μ L | % campioni di latte analizzati -circuito OVINO- | % campioni di latte analizzati -circuito CAPRINO- |
|---|---|---|
| <100 | 5,5 | 5,9 |
| 100-1000 | 42,2 | 34,2 |
| 1000-3000 | 21,4 | 20,0 |
| 3000-5000 | 9,5 | 11,2 |
| 5000-10000 | 13,1 | 12,7 |
| 10000-50000 | 8,3 | 16,0 |

Tab.4 - Distribuzione dei campioni analizzati in classi di UFC/ml

| Classi di UFC/ml | % -circuito OVINO- | % -circuito CAPRINO- |
|-------------------|--------------------|----------------------|
| < 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 |

Sono state calcolate le regressioni lineari tra Impulsi del BFC ($x = \text{Log BFC/ml}$) e Carica Batterica in Piastra ($y = \text{Log UCF/ml}$).

RISULTATI CIRCUITO OVINO

L'equazione di regressione ottenuta per il latte OVINO è stata la seguente:

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

Parametri della Regressione Lineare BFC/UFC

| N°campioni | Correlazione (r_Pearson) | R ² | Sy:x |
|------------|--------------------------|----------------|-------|
| 457 | 0,89 | 0,79 | 0,355 |

| Parameter | Coefficient | Std. Error | t | P |
|-----------|-------------|------------|---------|---------|
| Intercept | -0,5627 | 0,1452 | -3,8765 | 0,0001 |
| Slope | 0,9906 | 0,02370 | 41,7951 | <0,0001 |

Fig.3 - Diagramma di dispersione e retta di regressione tra log UFC/ml e log impulsi BFC/ml

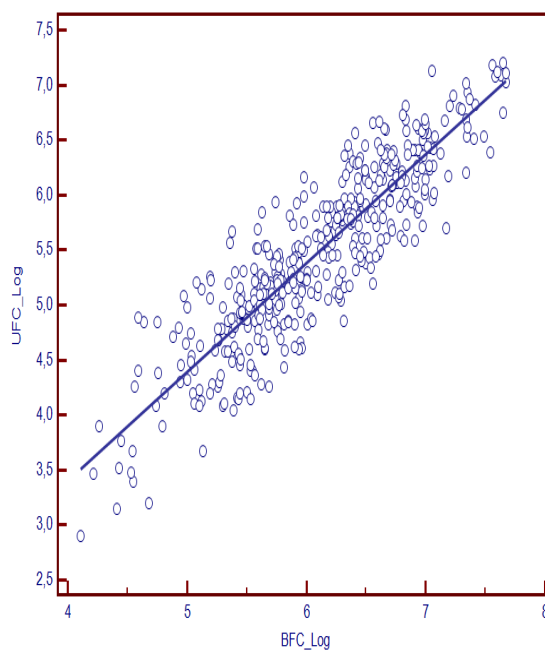
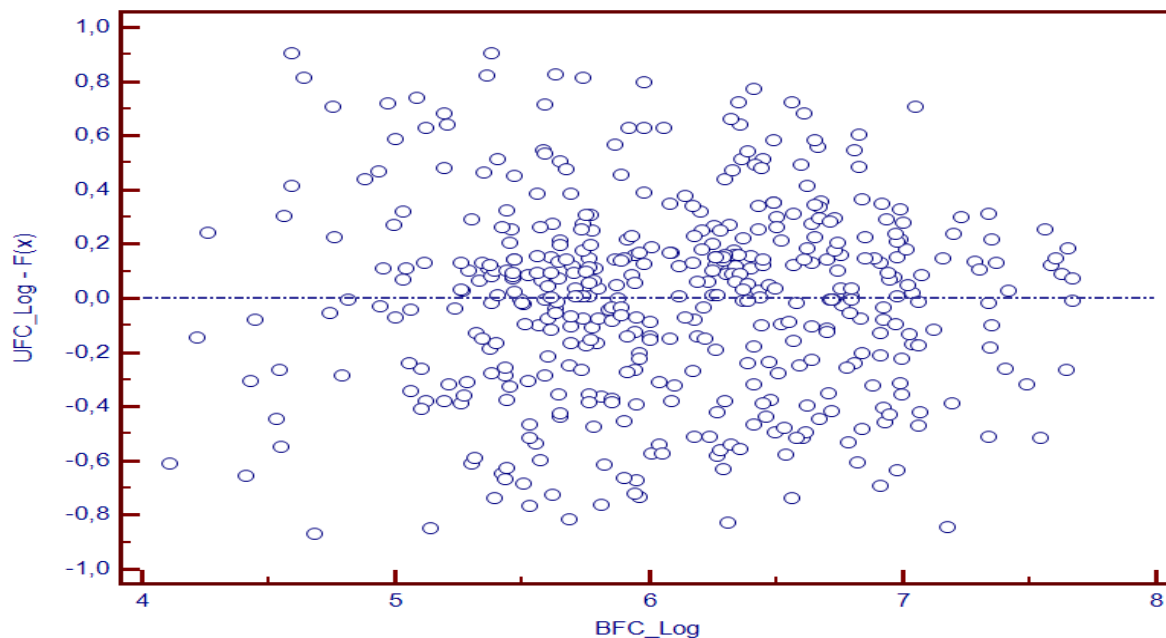


Fig.4 - Diagramma di dispersione dei residui



Tab. 5 – Tabella di conversione nazionale per latte ovino 2016

| IBC/ μ L | UFC/ μ L |
|--------------|--------------|
| 10 | 3 |
| 300 | 73 |
| 500 | 121 |
| 1.000 | 240 |
| 2.000 | 478 |
| 3.000 | 714 |
| 4.000 | 949 |
| 5.000 | 1184 |
| 10.000 | 2352 |
| 20.000 | 4674 |
| 50.000 | 11585 |

Differenze con la regressione calcolata nel 2012

L'elaborazione effettuata sui campioni analizzati nel primo circuito sul latte ovino, concluso a novembre del 2012, con 5 laboratori partecipanti aveva portato alla seguente regressione:

$$\text{Log}_{10} \text{ UFC/ml} = \text{Log}_{10} \text{ BFC/ml} \times 1,0104 - 0,6381$$

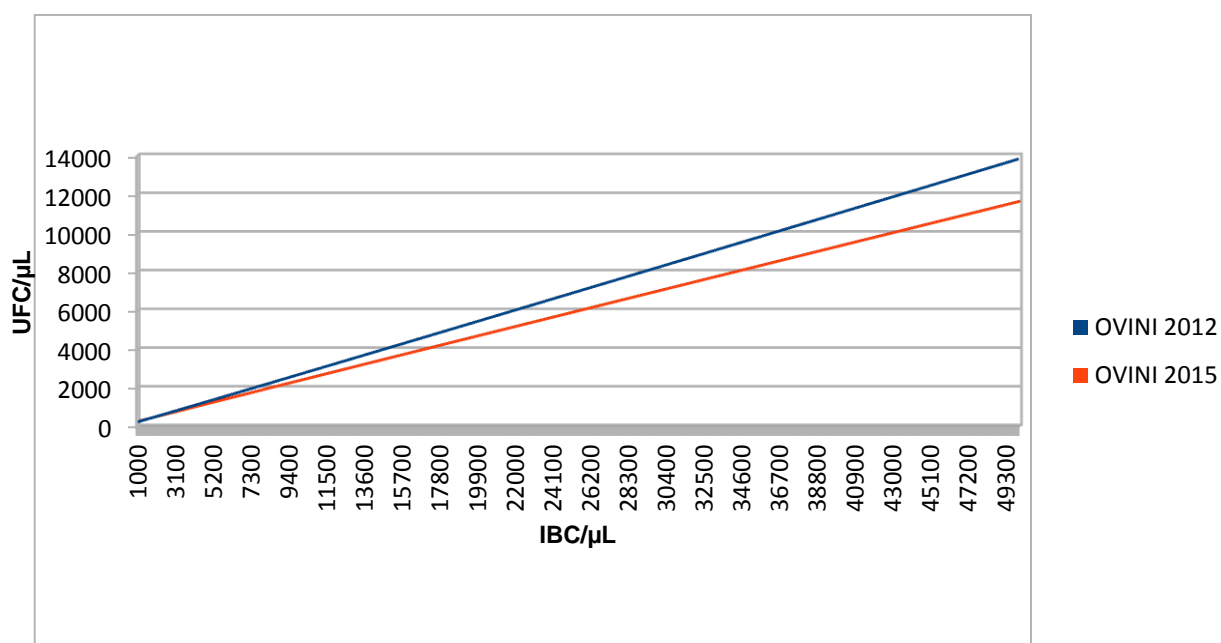
Parametri della Regressione Lineare BFC/UCF (30/11/2012)

| N°campioni | Correlazione (r) | R ² | Sy:x | Intercetta (Err.Std.) | Slope (Err.Std.) |
|------------|------------------|----------------|------|-----------------------|------------------|
| 343 | 0,85 | 0,72 | 0,41 | 0,202 | 0,0337 |

Confrontando la prima regressione (2012) con quella attuale (2015) si evidenzia un miglioramento nella stima, infatti la nuova regressione ha un limite di confidenza inferiore ($Sy:x = 0,35$) rispetto alla prima regressione ($Sy:x = 0,41$).

La nuova regressione determina una conversione del numero degli impulsi in UFC inferiore rispetto alla precedente, con valori compresi fra un minimo del 5% ed un massimo del 16%. (Fig. 5).

Fig. 5 - Confronto prima regressione 2012 e regressione 2016



Influenza delle cellule somatiche

Ultima considerazione riguarda il livello di cellule somatiche che è normalmente superiore a quello riscontrato nel latte bovino.

Il valore medio nel latte di massa, riscontrato da diversi autori, risulta di circa 1.200.000 cell/ml. Utilizzando i dati dei campioni per i quali erano stati forniti anche i valori di cellule somatiche, e limitando le osservazioni ai soli campioni con carica batterica mesofila <500.000 ufc/ml (197 campioni), la correlazione tra impulsi (IBC) e cellule somatiche è risultata di $r_{\text{Pearson}} = 0,66$ ($P < 0,001$) indicando una possibile influenza delle cellule somatiche sul valore degli impulsi.

E' necessario comunque approfondire tale aspetto con studi mirati.

Tab. 6 - Distribuzione in classi di delle cellule somatiche dei campioni (197) utilizzati per determinare la correlazione tra IBC e cellule somatiche

| Classi di cellule somatiche (cell/mlx1000) | % campioni |
|--|------------|
| <1000 | 36,5 |
| 1.000-2.000 | 47,8 |
| >2.000 | 15,7 |

CONSIDERAZIONI

Circuito ovino

Anche per questa elaborazione, i dati aggiunti a quelli già a disposizione, derivati dalla precedente prova, sono stati ottenuti durante tutto l'arco della lattazione, per ottenere un campionamento quanto più rappresentativo della realtà produttiva .

La carica batterica totale del latte di massa ovino è generalmente più elevata rispetto ai valori riscontrati nel latte bovino. Anche i limiti legislativi prevedono valori più elevati: 500.000 UFC/ml per il latte destinato alla produzione di formaggi a latte crudo e 1.500.000 UFC/ml per il latte destinato alla produzione di formaggi a latte pastorizzato , pertanto sulla base di questi limiti sono state indicate le numerosità di campioni da analizzare per fascia di contaminazione.

Nel latte ovino anche le cellule somatiche sono in genere più elevate rispetto al latte bovino.

La correlazione tra IBC e cellule somatiche ottenuta con questa prova è coerente con i dati rilevati già da altri autori (G.Suhren et al. , 1998), Bolzoni et al. , 2000) .

I risultati ottenuti con il presente lavoro hanno permesso un miglioramento importante dell' accuratezza della stima riducendo il valore $Sy:x$ da 0,41 (elaborazione 2012) a 0,355 (dato attuale) rientrando anche nel limite di 0,40 proposto dall'EURL-MMP .

RISULTATI CIRCUITO CAPRINO

L'equazione di regressione ottenuta per il latte CAPRINO è stata la seguente:

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

Parametri della Regressione Lineare BFC/UFC

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

| Parameter | Coefficient | Std. Error | t | P |
|-----------|-------------|------------|---------|---------|
| Intercept | -0,9060 | 0,1283 | -7,0637 | <0,0001 |
| Slope | 1,0274 | 0,02054 | 50,0135 | <0,0001 |

Fig. 6 - Diagramma di dispersione e retta di regressione (log UFC/ml vs log impulsi BFC/ml)

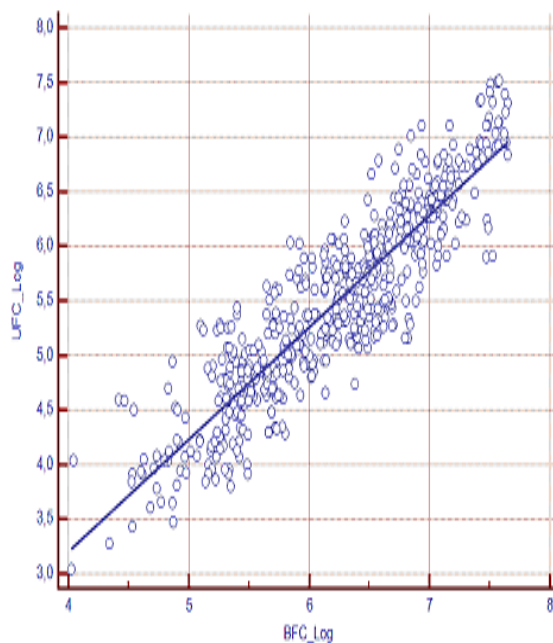
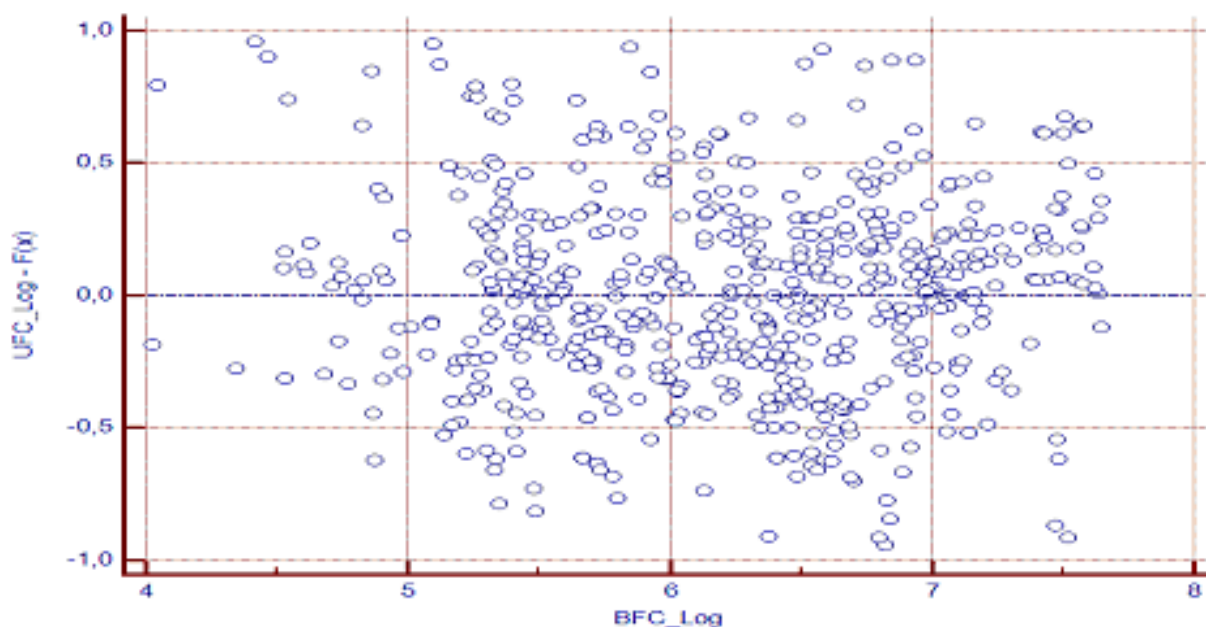


Fig.7- Diagramma di dispersione dei residui



L'esame della dispersione dei residui mostra un andamento normale:

Tab 7- Tabella di conversione nazionale per latte caprino 2016

| IBC/ μ L | UFC/ μ L |
|--------------|--------------|
| 10 | 2 |
| 300 | 53 |
| 500 | 89 |
| 1.000 | 181 |
| 2.000 | 370 |
| 3.000 | 561 |
| 4.000 | 753 |
| 5.000 | 947 |
| 10.000 | 1931 |
| 20.000 | 3936 |
| 50.000 | 10091 |

Influenza delle cellule somatiche

Analogamente a quanto effettuato per il latte ovino, abbiamo verificato, con i risultati a disposizione, se l'aumento del numero delle cellule somatiche possa aver determinato un incremento nel numero degli impulsi (IBC).

Dai campioni utilizzati per la determinazione della regressione sopra descritta erano disponibili per la maggior parte dei campioni (461 campioni) i valori di cellule somatiche.

Per verificare l'eventuale influenza delle cellule somatiche abbiamo utilizzato i campioni con carica batterica mesofita <500.000 UFC/ml a cui era abbinato il numero delle cellule somatiche (n. 273 campioni).

Nella tabella 4 è rappresentata la distribuzione in classi di cellule somatiche dei campioni utilizzati.

La correlazione tra impulsi (IBC) e cellule somatiche è risultata di $r = 0,11$ (r_{Pearson}) ($P=0.07$).

Pur con una distribuzione dei campioni in classi di cellule somatiche molto simile a quella del latte ovino, il valore di correlazione riscontrato nel presente studio risulta essere molto inferiore e statisticamente non significativo.

In analogia a quanto detto per il latte ovino, è necessario procedere con studi mirati atti a quantificare l'eventuale influenza del numero delle cellule somatiche sul conteggio degli IBC.

Tab. 8 - Distribuzione in classi di delle cellule somatiche dei campioni (273) utilizzati per determinare la correlazione tra IBC e cellule somatiche

| Classi di cellule somatiche (cell/mlx1000) | % campioni |
|--|------------|
| <1000 | 27,7 |
| 1.000-2.000 | 51,1 |
| >2.000 | 21,2 |

CONSIDERAZIONI

Circuito caprino

Anche per questa elaborazione i campioni di latte sono stati prelevati durante tutto l'arco della lattazione, per comprendere quanto più possibile le eventuali influenze derivanti dalle diverse tipologie di conduzione dell'allevamento, dovute principalmente alla stagionalità della produzione.

I limiti legislativi prevedono valori più elevati rispetto al latte bovino: 500.000 UFC/ml per il latte destinato alla produzione di formaggi a latte crudo e 1.500.000 UFC/ml per il latte destinato alla produzione di formaggi a latte pastorizzato e pertanto se ne è tenuto conto nella scelta dei livelli di contaminazione dei campioni da analizzare per questa prova.

Nel latte caprino di massa il numero delle cellule somatiche è molto simile a quello riscontrato in media nel latte ovino, ma a differenza di quest'ultimo, non è stata evidenziata una correlazione significativa tra IBC e cellule somatiche.

L'elaborazione ottenuta con il presente lavoro ha evidenziato un'accuratezza della stima $Sy:x$ di 0,37 rientrando nel limite di 0,40 proposto dall'EURL.

BIBLIOGRAFIA

- ISO 4833-1:2013 - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 degrees C.
- ISO 16140:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods.
- ISO 21187:2004 - Quantitative determination of bacteriological quality – Guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results.
- ISO 16297:2013 - IDF 161 – Milk – Bacterial count – Protocol for the evaluation of alternative methods
- ISO 7218:2007/Amd.1:2013– Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
- ISO 8196-1:2000 – Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis – Part1: Analytical attributes of indirect methods.
- ISO14461-2 Milk and milk products - Quality control in microbiological laboratories - Part 2: Determination of the reliability of colony counts of parallel plates and subsequent dilution steps
- G. Bolzoni, A. Marcolini and G. Varisco (2000) – Evaluation of Bactoscan FC. 1. Accuracy, comparison with the Bactoscan 8000 and somatic cells effect. *Milchwissenschaft*, 55 (2).
- G.Suhren, H.G. Walte (1998) – First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 50, 249-275.



Anna Maria Ferrini

Responsabile

Laboratorio Nazionale di Riferimento per il latte e i prodotti a base di latte

e-mail: lnr.latte@iss.it

Gilberto Giangolini

Responsabile

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

e-mail: creldoc@izslt.it