



30 Aprile 2013 ROMA

CONVERSIONE NAZIONALE BACTOSCAN FC Risultati del Progetto LNR Latte - CNRQLB - 2012

Dr. Giuseppe Bolzoni

Centro Referenza Nazionale Qualità Latte Bovino

Istituto Zooprofilattico Lombardia ed Emilia Romagna - Brescia - Italy



BREVISSIMI CENNI STORICI

- **Anni 80** – Introduzione degli strumenti automatici per la determinazione della CBT – grande miglioramento tecnico (rip, costi, tempi) - Modalità di Conversione autogestite dal singolo Lab.
- **Anni 90** – Prime sperimentazioni (Grappin) individuazione della Regressione Lineare – Modalità di Conversione autoprodotte da Singoli laboratori o «adottate» dalla letteratura
- **Anni 2000** – Esperienze con Bactoscan FC pubblicazione di Conversioni (Shuren, Bolzoni)
- **Anni 2000-** Normativa Internazionale concetto di Conversione su base geografica autoprodotta da singolo laboratorio raramente applicata
- **2009** – Progetto di Unificazione della Conversione su base nazionale ed adozione volontaria
- **2003-2010**– Progetti simili (internazionale Bactocount Bentley , Germania , latte di altre specie)
- **2012** – Progetto di CONVERSIONE NAZIONALE in Italia - Avvio di studio Comunitario per confronto tra Conversioni Nazionali e strumenti diversi con obiettivo «Conversione Comunitaria»

DI CHE PROBLEMA STIAMO PARLANDO ?

Il problema era, è e sarà che :

non si potrà mai definire in modo diretto ed in condizioni routinarie, quanti e quali batteri ci sono in un singolo campione di latte e, soprattutto, in che modo andranno a produrre colonie

D'altra parte, applicando il metodo di Riferimento, è impensabile realizzare analisi con la frequenza prevista dalla Normativa Comunitaria su tutti gli allevamenti seguiti dai Laboratori Centralizzati a costi e con tempi sostenibili e con performances analitiche adeguate , Val la pena di aggiungere che il Metodo di Riferimento conta comunque «solo» i batteri in grado di formare colonia in determinate condizioni

Chi ricorda come si lavorava prima del Bactoscan nei nostri laboratori ?

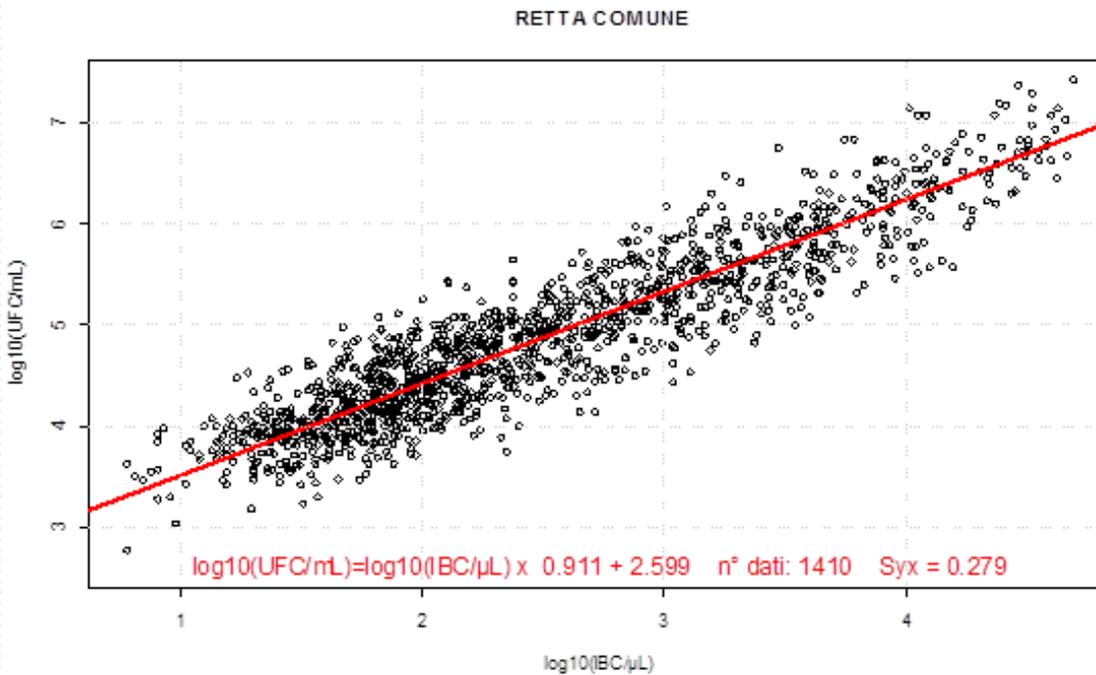
La statistica ci aiuta a limitare l'incertezza della conversione che rimane comunque elevata .

Una delle cause dell'elevata incertezza è però il fatto che Metodo di Riferimento ha un'incertezza di misura significativamente superiore a quella del metodo Alternativo .

Di questo si deve tener conto quando si definiscono protocolli di lavoro e si assumono decisioni operative e di questo abbiamo tenuto conto noi fin dall'inizio del Progetto realizzato nel 2009 .

DOVE ERAVAMO RIMASTI

- ❑ 15 Lab , 1.410 dati Validi , $S_{yx} = 0,279$ Log
- ❑ campo di misura 10 – 50.000 Impulse / μL
- ❑ Utilizzo volontario con zone extra campo di misura di libera adozione



2012 FINALITA' DEL NUOVO PROGETTO

- Maggior rappresentatività delle caratteristiche del latte prodotto in Italia
- Maggior Robustezza della stima
- Possibile ampliamento del Campo di Misura
- Verifica e Validazione/ Aggiornamento del lavoro svolto in precedenza
- Ufficializzazione di una Modalità di Conversione Nazionale
- Presentazione del lavoro svolto e dei risultati ottenuti in ambito Comunitario

***In pratica** : ottimizzare la riproducibilità del metodo con ovvi vantaggi sia dal punto di vista commerciale (Sistema di Pagamento Latte Qualità) che sanitario (Normativa Comunitaria per Autocontrollo e Controllo Ufficiale)*

Sintesi Attività Svoluta

- ✓ Stesso Protocollo Operativo del 2009 : doppia replica Bactoscan, 2 Piastre x 2-3 diluizioni (Differenza rispetto a EN ISO 4833 : diluizioni seriali eseguite in unica serie al fine di consentire la valutazione di congruenza degli esiti)
- ✓ Campioni di Latte crudo bovino senza conservante in genere analizzati entro 24-48 ore da mungitura
- ✓ Numero di campioni differenziato per Laboratori (Nuovi e Vecchi)
- ✓ Distribuzione Campioni modificata con maggior rilevanza delle contaminazioni molto alte

- ✓ Prova Interlaboratorio su campioni liofilizzati in matrice latte per verifica funzionalità strumenti utilizzati
 - ✓ Raccolta ed elaborazione statistica dei dati – Produzione di retta di Conversione 2012

- ✓ Riasssemblamento dei dati 2009 e 2012 – Elaborazione statistica e produzione di una proposta di **CONVERSIONE NAZIONALE**

- ✓ Presentazione del lavoro svolto al Meeting Annuale Lab. Nazionali Riferimento (ANSES) per l'avvio di uno studio di fattibilità di una Conversione Comunitaria per ambedue gli strumenti in commercio

RISULTATI -

Estratto del Report inviato ai partecipanti (Rev. 3 consegnata oggi !!!)

29 Laboratori hanno inviato dati analitici relativi a 1897 campioni di latte

SELEZIONE DEI DATI VALIDI

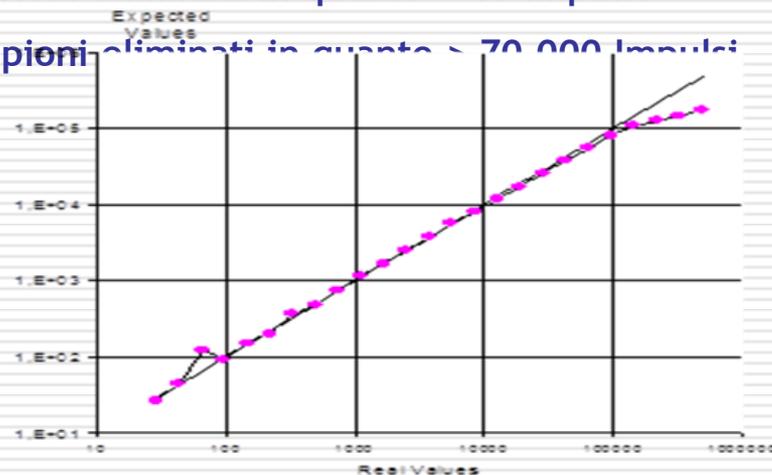
1- Eliminati 19 campioni per inidoneità risultati (mancanze varie)

Il Laboratorio n 22 non ha realizzato le previste “doppie” repliche delle determinazioni strumentali e in piastra.

Il Laboratorio 26 ha riportato, in gran parte, esiti relativi ad una sola diluizione per il metodo di riferimento

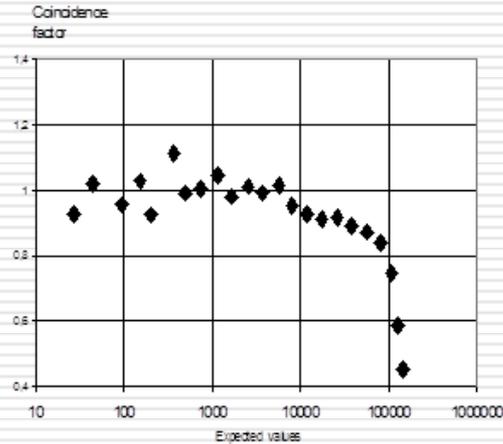
2- Linearità Strumentale - 12 Campioni eliminati in quanto < 10 Impulsi

53 Campioni eliminati in quanto > 70.000 Impulsi

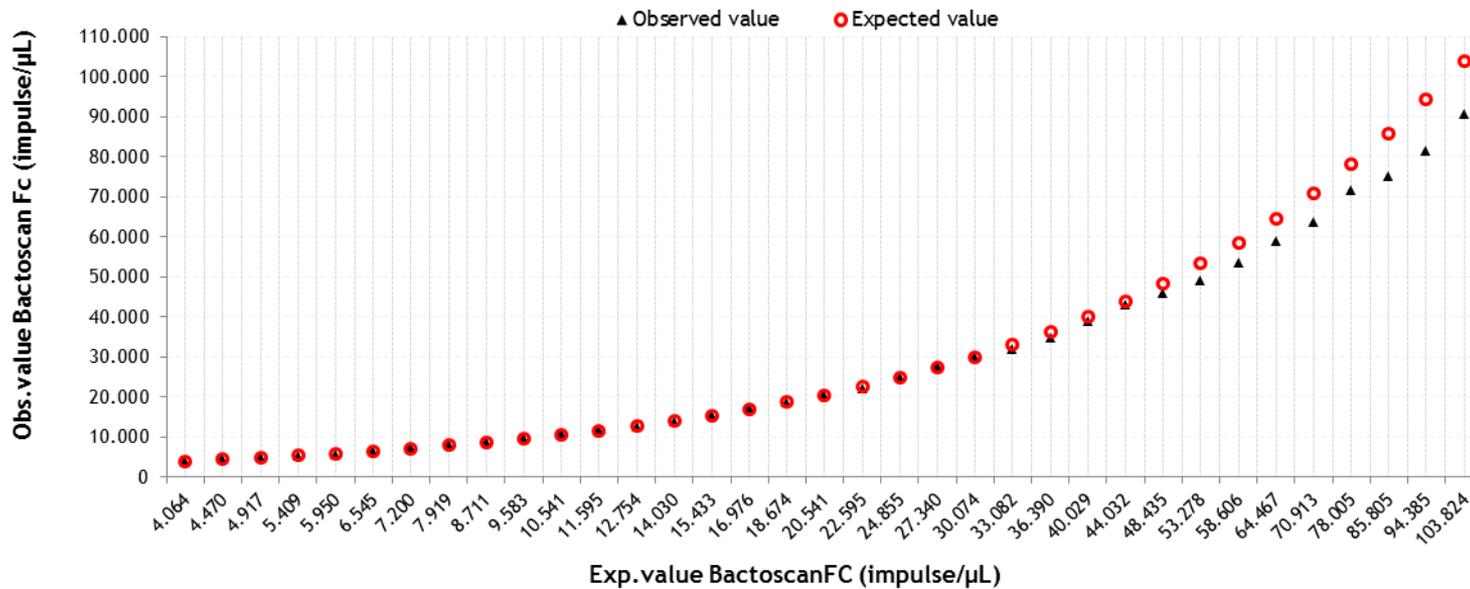


•G. Bolzoni et al. 2001 - Evaluation of Bactoscan FC. Second Part: Stability, Linearity, Repeteability and Carry-over. Milchwissenschaft- M. S. Int., (56), n 6

Linearità Strumentale e Campo di Misura



- 20.000
- 35.000
- 50.000
- 70.000



SELEZIONE DATI VALIDI

3 – Eliminati 53 Campioni per Ripetibilità Strumentale

I valori delle due repliche strumentali superava il limite di ripetibilità atteso per le repliche (31 campioni) e anche quello di riproducibilità (12 campioni)

** : limiti non sono fissi ma dipendono dal livello di contaminazione come “Differenza Critica del Valore Logaritmico tra Repliche > 2,83 DS con 95% di confidenza” .

Risultato Media	Campione N	Rep1	Rep2
979	15	1003	955
36,5	16	36	37
1193	17	1153	1233
11687	19	11692	11683
90*	20	105	75
115,5	21	114	109
24	74	24	24
82	75	89	75
301,5 **	76	367	236

SELEZIONE DATI VALIDI

6 - Subdispersione dei risultati in Piastra

Analisi della Varianza tra conteggio in piastra e risultato atteso tra repliche e diluizioni

Valore della Devianza

Nessun campione è stato eliminato per questo criterio ; la frequenza dei casi “subdispersi” è stata però presa in considerazione, con altri fattori, per decisioni successive

7 - Performances del singolo laboratorio

Analisi congiunta dei seguenti aspetti

CRITICAL
POINT!

- Frequenza casi di sub-dispersione (Punto 6)
- Dispersione della Retta di Conversione singola (eccessivamente ridotta o elevata)
- Frequenza di dati eliminati nella valutazione del G2 Factor (Punto 5)
- Sistematically delle differenze tra Laboratori

SELEZIONE LABORATORI

IN ALCUNI CASI SI TRATTA DI DECISIONI ALMENO IN PARTE «PERSONALI» CHE, ANCHE QUANDO BASATE SU ELEMENTI STATISTICI, POSSONO ESSERE CRITICATE

SI E' CERCATO DI APPLICARE IL PRINCIPIO DI SCELTA PIU' UTILE ALLA PRODUZIONE DI UN RISULTATO FINALE ROBUSTO ED AFFIDABILE

Esempio : cosa fare dei «campioni validi» di un Laboratorio con eccessiva frequenza di campioni eliminati al G2 Factor Test

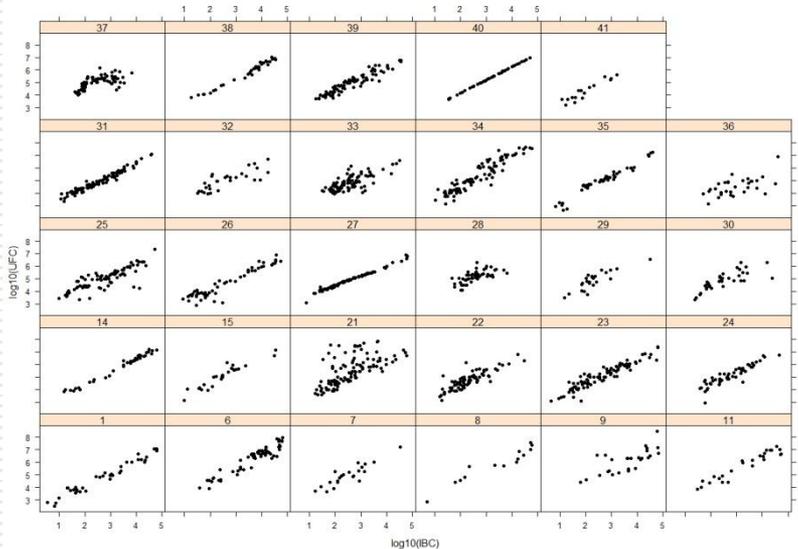
Non si tratta di un «giudizio» sull'aver operato bene o male ma soltanto di una valutazione statistica e di opportunità dell'utilizzo di dati analitici in funzione delle finalità di questa prova

La descrizione puntuale di questi aspetti può fornire utili indicazioni a ciascun laboratorio relativamente a possibili aree di miglioramento , verifica, approfondimento di aspetti tecnico-operativi che esulano dallo scopo del presente lavoro e verrà realizzata in sezione apposita

SELEZIONE DATI VALIDI

7.1 Dispersione della retta di conversione singolo laboratorio

I laboratori n° 21, 36, 9, 32, 8, 30, 25, 34 e 33, risultano superiori al limite indicato attualmente come ottimale $< 0,040 \text{ Log}_{10} \text{ Sy:x}$



(Intercept)	log10(IBC)	Sy:x	lab	count
2,118424	1,030969	0,013929	40	50
2,90256	0,779742	0,093097	27	98
2,44324	0,991188	0,14555	14	42
2,2563	1,02797	0,157787	38	36
2,336315	1,040822	0,251726	31	93
2,197675	1,07117	0,2556	35	52
2,171817	1,085945	0,259445	41	16
2,128098	0,996639	0,267685	1	40
2,621987	0,891492	0,276665	39	88
2,55388	1,011904	0,308652	15	26
2,54089	0,971149	0,311806	11	26
2,639418	0,925731	0,322378	23	98
2,482917	0,959331	0,329199	24	50
2,277481	1,092757	0,336567	6	68
3,526002	0,641399	0,354684	28	54
3,662052	0,550801	0,370751	37	79
2,756182	0,859256	0,375691	22	76
2,180667	0,948479	0,376675	26	55
2,474738	1,003358	0,383055	7	22
2,72386	0,929378	0,389306	29	24
3,073394	0,695005	0,41044	33	89
2,178295	1,202943	0,41459	34	103
2,895919	0,76908	0,428628	25	97
2,875925	0,796465	0,43793	30	36
2,62505	0,953103	0,441061	8	34
3,179626	0,69743	0,456749	32	29
3,009938	0,864381	0,622565	9	30
2,532597	0,689751	0,638689	36	32
3,193983	0,888142	0,850489	21	110

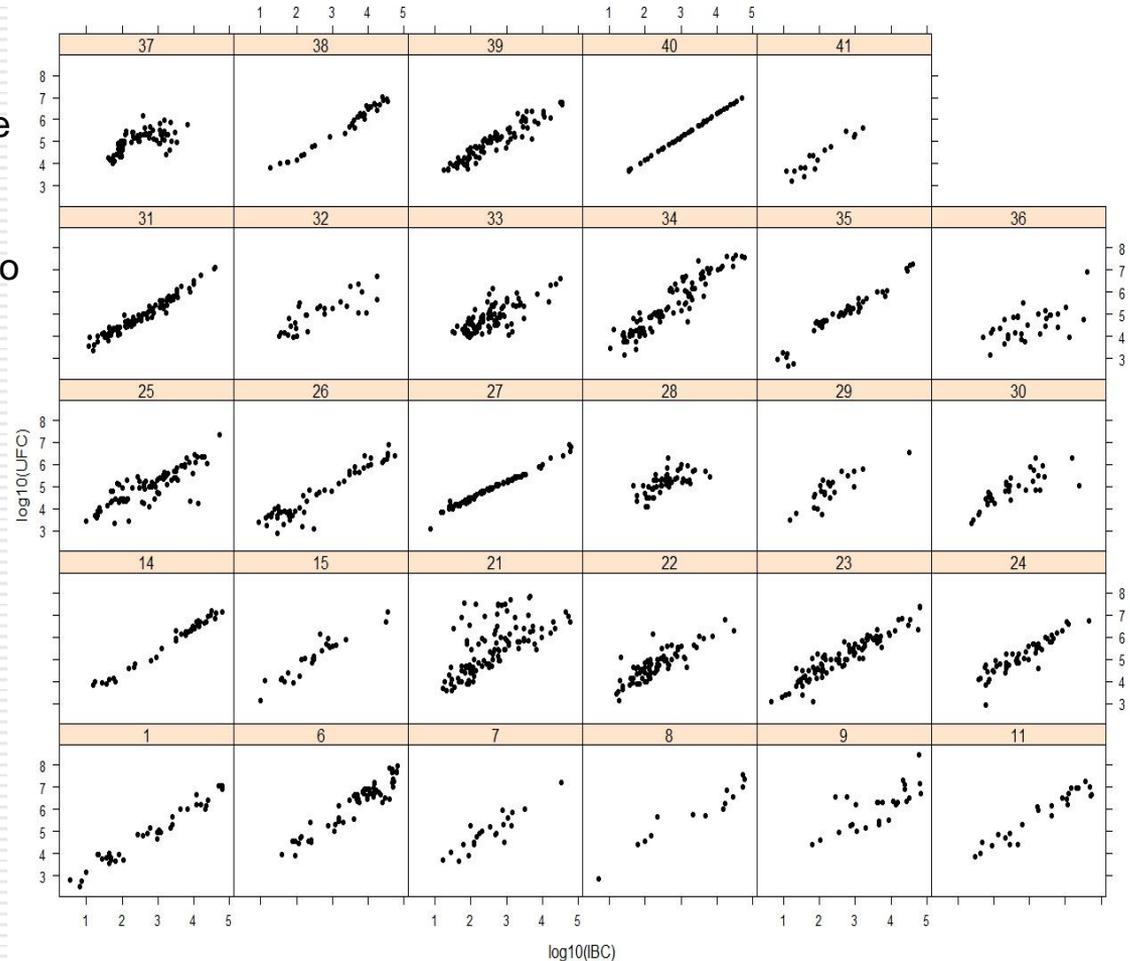


SELEZIONE DATI VALIDI

7.2 Dispersione della retta di conversione singolo laboratorio

Il Laboratorio 40 presenta un valore di $\text{Log}_{10} \text{Sy}:x$ ritenuto anormalmente basso 0,0139

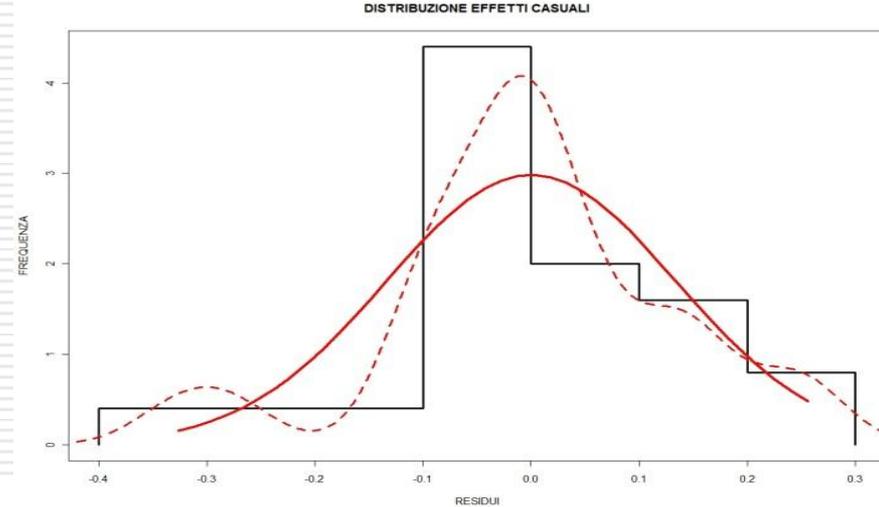
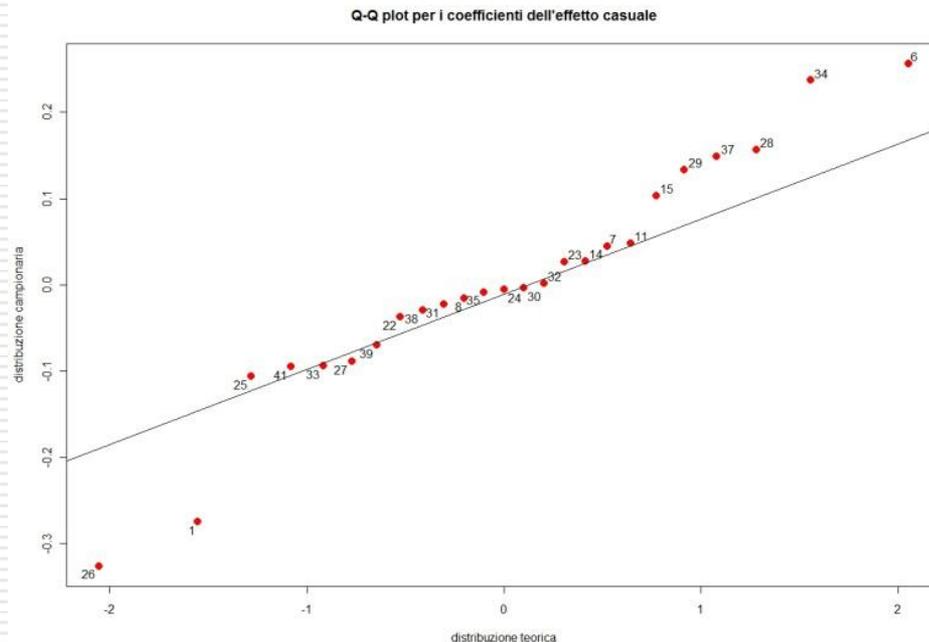
(nel 2009 il valore più basso è stato 0,13 come ; nel 2012 i più bassi sono 0,09 e 0,14)



SELEZIONE DATI VALIDI

7.3 Sistematicità delle Differenze

Rispetto alla distribuzione Normale degli Effetti Casuali
I Lab. 6 e 34 tendono sistematicamente a sovrastimare
I Lab. 1 e 26 tendono sistematicamente a sottostimare



SISTEMATICITA' DELLE DIFFERENZE :

Dipendono da flora batterica diversa o da differente applicazione del metodo di riferimento ?

IMPOSSIBILE RISPONDERE

(il caso del 2009)

SELEZIONE DATI VALIDI

7. 4 Frequenza

Eliminazione da G2 Factor

Non definibile un limite di accettabilità .

La quantità di campioni eliminati (percentuale rispetto a quelli eseguiti) costituisce quindi un parametro indiretto utilizzato in associazione agli altri di valutazione delle performances di laboratorio

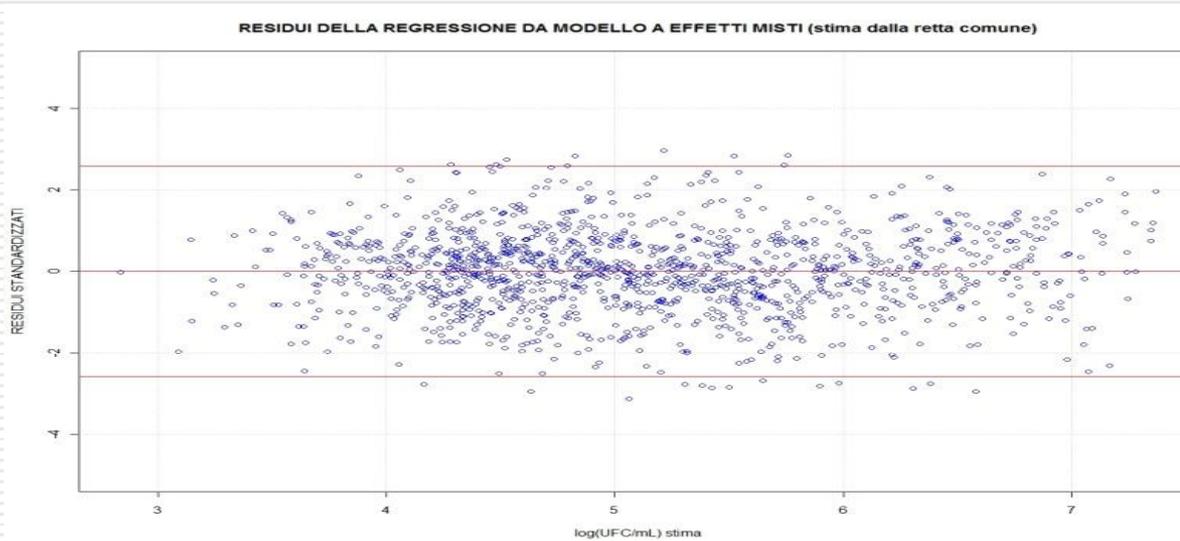
LAB	% Camp Eliminati G 2 Factor	LAB	% Camp Eliminati G 2 Factor	LAB	% Camp Eliminati G 2 Factor
1	0	30	5	8	0
21	2	26	0	32	0
22	9	31	6	14	0
23	1	7	19	34	3
24	0	33	11	35	0
25	6	9	0	36	62
27	2	15	27	41	0
28	42	6	0	37	4
29	0	11	7	38	0
39	5	40	2		

SELEZIONE LABORATORI

LAB	FATTORI	DECISIONE *
22	Manca doppia replica Metodo di Riferimento e Strumentale	Elaborazione separata; Mantenuto
26	<ul style="list-style-type: none"> Eseguita una sola diluizione Differenza Sistemica 	Mantenuto
9	Dispersione Retta Eccessiva	Eliminato
36	<ul style="list-style-type: none"> Dispersione Retta Eccessiva Eccessiva Frequenza Eliminati G2 F 	Eliminato
21	Dispersione Retta Eccessiva	Eliminato
32	Dispersione Retta Leggermente Eccessiva	Mantenuto
8	Dispersione Retta Leggermente Eccessiva	Mantenuto
30	Dispersione Retta Leggermente Eccessiva	Mantenuto
25	Dispersione Retta Leggermente Eccessiva	Mantenuto
34	<ul style="list-style-type: none"> Dispersione Retta Leggermente Eccessiva Differenza Sistemica 	Mantenuto
33	Dispersione Retta Leggermente Eccessiva	Mantenuto
40	Dispersione Retta Troppo ridotta	Eliminato
6	Differenza Sistemica	Mantenuto
1	Differenza Sistemica	Mantenuto
28	Eccessiva Frequenza Eliminati G2F	Mantenuto
15	Eccessiva Frequenza Eliminati G2 F	Mantenuto

Decisione ANCHE in relazione al numero di campioni validi residui (influenza sulla retta)

RETTA DI CONVERSIONE PROGETTO 2012



- Multistep Selection of Outliers * (S.E. < 2,58)

N	Syx	Intercept	Slope	Min Std. Residual	Max Std Residual
1	1388	0,354705958	2,613817425	0,925564047	4,21435802 -5,800399803
2	1355	0,30332177	2,601365294	0,934261104	2,96969762 -3,126132535
3	1333	0,2848558	2,57999473	0,943019856	2,755133414 -2,692223201
4	1323	0,278059	2,569411	0,946037	2,671899 -2,618375
5	1316	0,273562449	2,569492368	0,945663311	2,67265 -2,607722768
6	1312	0,271053444	2,569272367	0,945485456	2,575150934 -2,584455657
7	1311	0,270409847	2,571557482	0,945037827	2,582369421 -2,54657828
8	1310	0,269820674	2,573227897	0,944295469	2,578365111 -2,549777972
9	1310	0,269820674	2,573227897	0,944295469	2,578365111 -2,549777972

NOTA :

La procedura di selezione degli Out liers è specificatamente prevista per elaborazioni relative a singolo laboratorio (ISO 21187 : 2006) . La sua applicazione nell'analisi Linear Mixed Effect Model può essere considerata una "estensione" e serve a ottimizzare lo scarto residuo .

In questo ambito diventa di fatto una sorta di valutaizione della significatività delle differenze di singoli campioni rispetto a tutti gli altri tenendo conto ANCHE della loro origine (effetto Lab). Gli out liers risultano quindi selezionati sulla base combinata tra differenze sistematiche (bias) e proporzionali (Slope)

CONVERSION LINE

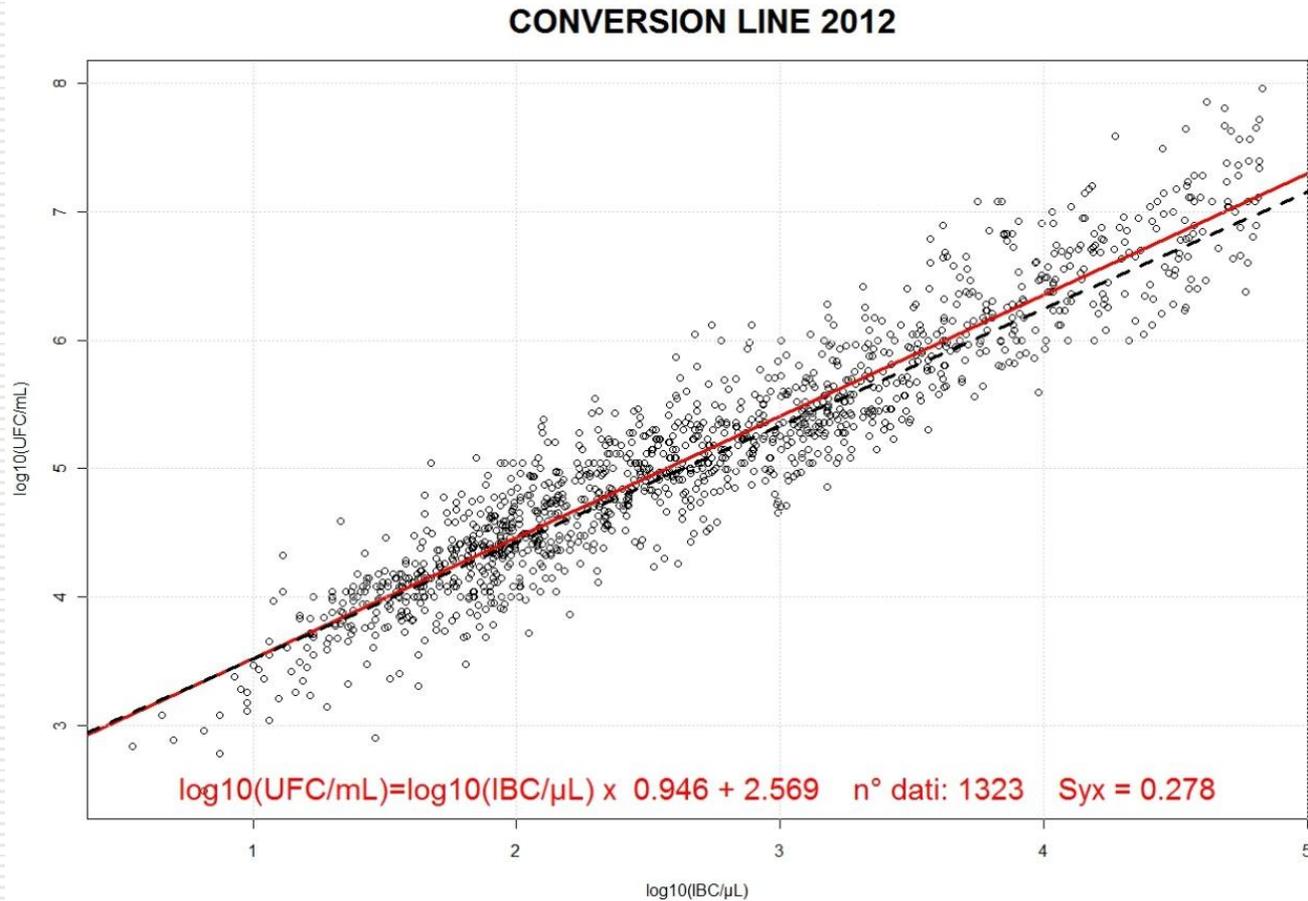
APPROCCIO STATISTICO :

1. Single Lab Conversion Line (for internal use only)
2. Overall Cumulative Regression Line (no evaluation of “Lab’s effect”)

Linear Mixed Effect Model / Modello Lineare ad Effetti Misti
Consente di considerare l’effetto laboratorio che è da ritenere
fondamentale in funzione della variabilità insita nel Metodo di Riferimento

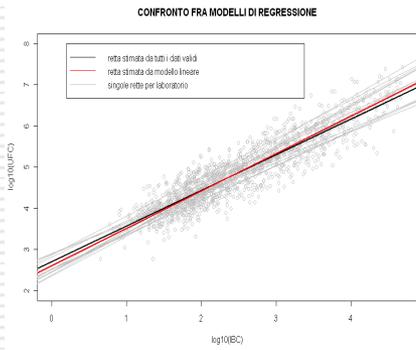
2012 Conversion line (A)			Number obs. 1.323		S yx	0,278
	coef	st.err	t	Sig	low	hig
inter	2,569	0,038	67,570	0,000	2,493	2,645
log ibc	0,946	0,009	106,910	0,000	0,928	0,964

RETTA DI CONVERSIONE PROGETTO 2012



Ma non è ancora finita!!!

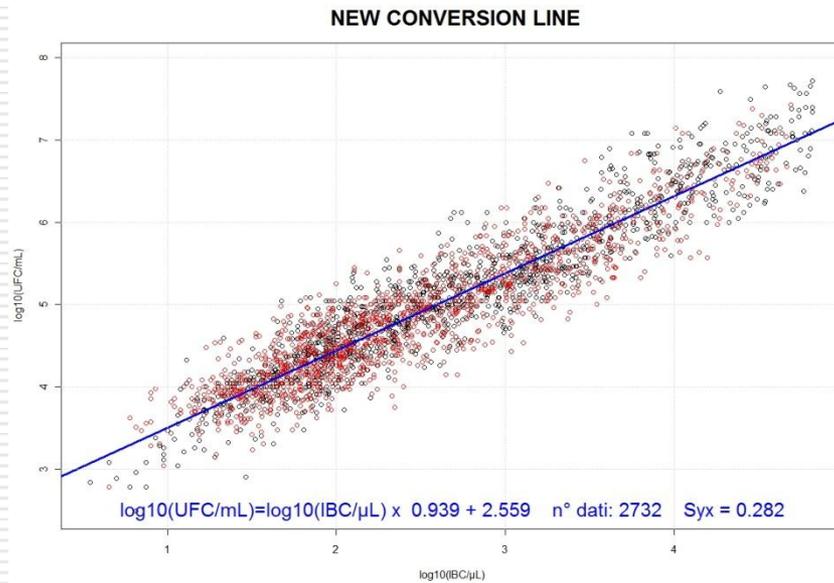
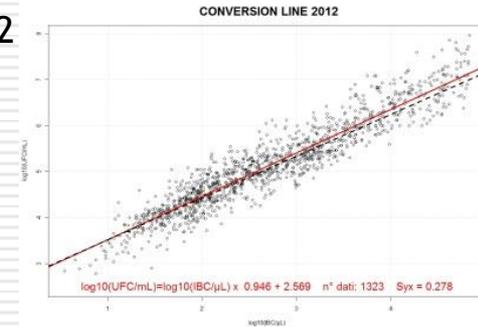
NUOVA RETTA DI CONVERSIONE NAZIONALE



2009

- Cocktail Conversion Line (strano ma lecitissimo)
- Ripetizione Outliers selection sui dati originali

2012



CAMPO DI APPLICAZIONE
70.000 Impulse/uL

Conversion line (B) mixed
2009 and 2012

			Number obs. 2.732	Syx	0,282	
	coef	st.err	t	Sig	low	hig
inter	2,559	0,032	80,770	0,000	2,496	2,622
log ibc	0,939	0,006	150,380	0,000	0,927	0,952

EFFETTO PRATICO DELLA APPLCIAIZONE (tenuto conto delle indicazioni fornite nel Report Risultati per valori sotto soglia , limite di linearità e numero fasce)

IBC	ISta 1	Stat 2	Stat 3	Stat 4	2009	2012	Official New National C.L.
10	3	3	3	3	3	3	3
30	9	9	9	9	9	9	9
50	15	15	14	14	14	15	14
70	20	20	19	19	19	21	20
100	28	28	27	27	26	29	27
150	42	42	40	40	38	42	40
300	80	81	76	77	72	82	77
400	106	107	99	101	93	107	101
700	180	182	168	173	155	182	171
1000	252	256	235	243	215	256	239
2000	487	496	450	472	404	492	457
5000	1161	1192	1063	1135	931	1172	1082
10000	2243	2311	2037	2202	1750	2257	2075
20000	4332	4481	3904	4274	3290	4349	3979
50000	10340	10755	9224	10268	7582	10347	9412
100000	19970	20856	17678	19926	14256	19934	18050



Tanto rumore per nulla ??

[William Shakespeare](#)

Ringraziamento COLLETTIVO

A tutti i colleghi che nei diversi Laboratori hanno consentito la realizzazione del progetto

Ringraziamento SPECIALE

Ad Antonio Marcolini tecnico coordinatore del Lab. Latte di Brescia senza la cui competenza tecnico –statistica Nessuna delle due parti del progetto avrebbe potuto essere realizzata