



LA NOSTRA
ESPERIENZA,
LA VOSTRA
SICUREZZA.



IMPULSI vs UFC
breve storia di una lunga sfida

25/01/2017
Padenghe D.G.



... tutto comincia con



Bactoscan Serie 1 : cosa contava davvero?

Quanto costava davvero l'analisi ?

Precisione, accuratezza ?

Il problema della «conversione» era ancora un mistero per tutti (1 Baviera e 1 Thiene , 1° esempio italiano)



Sample capacity	Approx. 70 per hour
Analysis time	7 minutes
Measuring range	$10^5 - 10^7$ bacteria/ml
Repeatability (Sd)	15% (typically)
Correlation to plate count	Approx. 0.9
Transfer error	≈ 0.3% relative
Sample size	5 ml
Sample temperature	38 - 42°C

Erano i tempi del metodo R.S. Breed Determination of the number of bacteria in milk by direct microscopic examination – del 1911 !!!



Dalla preistoria alla storia... fine anni '80



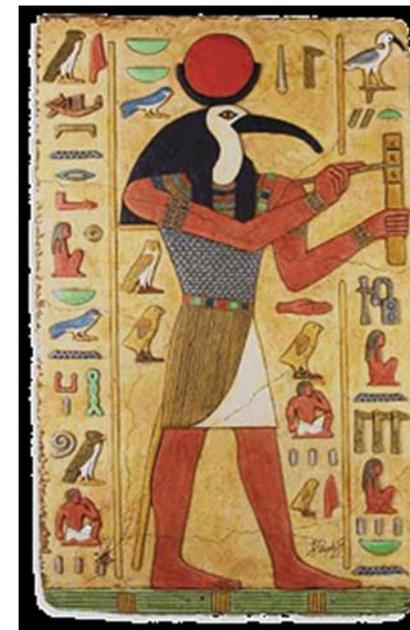
Il Bactoscan 8000

Rapidità, Ripetibilità, Uniformità, Economicità

Il nostro «collaudo nazionale» ed i primi dubbi scientifici :

Il ritiro del latte «caldo» e i lattobacilli sul PCA

Quante e Quali Conversioni servono ?



Il Petri-Foss è un sistema interamente automatico destinato alla preparazione delle piastre per la qualità igienica del latte crudo.

Erano i tempi del FIL-IDF 100:1981 e del Metodo di Thompson di Standards Methods dichiarato con 40 % di ripetibilità!!



Il BactoScan dà risultati più precisi ed uniformi dei metodi tradizionali.



LA CONVERSIONE IN 2 PAROLE



- Il Bactoscan conta, con elevata precisione, tutti i batteri presenti in un campione di latte che sono in grado di colorarsi (arancio di acridina / etidio bromuro).
- Il Metodo di Riferimento (ISO 4833:2013) conta le colonie formate da quei batteri presenti in un campione di latte in grado di moltiplicarsi in condizioni predefinite

Il rapporto tra i due «numeri» (Impulsi e UFC) oltre ad essere variabile a seconda del campione di latte esaminato, dipende anche dalle rispettive performances ed incertezza dei due metodi :

- *nel primo caso soprattutto presenza di batteri disvitali e detriti colorabili*
- *nel secondo tipo di terreno di coltura, tempo e temperatura di incubazione, atmosfera, stato metabolico microrganismi, miscelazione campioni, diluizione latte, manualità operatore, tipo di conteggio etc.etc.)*

Si deve cercare una relazione tra le due misure per «CONVERTIRE» il numero di Impulsi strumentali nell'unità di misura Ufficiale (UFC/ml) ; la relazione trovata è statisticamente significativa, comporta un determinato livello di incertezza ed è in ogni caso una scelta di compromesso.



La civiltà classica



F. Kaereby – Bactoscan 8000 made for EEC regulated bacteria control of raw milk-
Int. Congress on Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology – Helsinki – June 1990

ABSTRACT

The development of Bactoscan 8000 was initiated because the EEC decided that a grading limit equal to 100,000 CFU/ml should be applied by all member states from 1.1.1991.

The purpose of the work presented here is to evaluate the accuracy and precision of the Bactoscan 8000 at levels below 100,000 CFU/ml in relation to the Standard Plate Count and the Petri-Foss method. The materials were authentic data originating from independent laboratories, and the statistical method applied was presented by the author at the International Seminar on Modern Microbiological Methods in 1988, published in the International Dairy Federation-Special Issue No 8901 (1989).

Typical results for the performance of the Bactoscan 8000 were:
Limit of Determination = 30,000 CFU/ml.
Standard Deviation of the Estimate: Less than 0.400 log CFU/ml.
Standard Deviation of Repeatability: Less than 0.057 log CFU/ml.

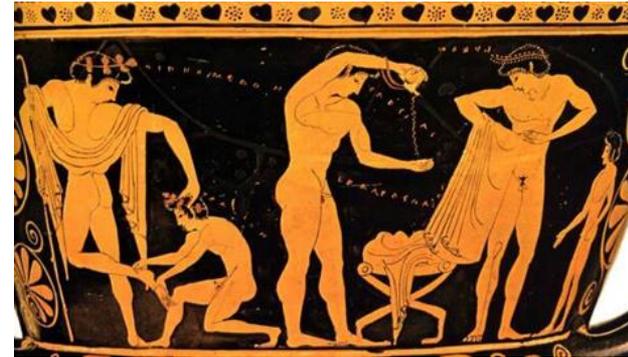
Conclusion: Bactoscan 8000 is in close agreement with the Standard Plate Count method at levels greater than or equal to 30,000 CFU/ml and even better than the Standard Plate Count method with respect to linearity.

ACKNOWLEDGEMENTS:

I want to thank professor Heesch, director Weiss, dr. Boni and dr. Grappin for giving me access to the authentic data. A special thank to dr. Suhren for her painstaking evaluation of every modification of the Bactoscan instrument during the experimental stage.

ADDRESS:

Fleming Kaereby, Foss Electric, 69-Slangerupgade, DK-3400 Hillerød, Denmark



Summary of the IDF 256/1991

Annex (B). The limits for first-class milk samples correspond to 400 000 ufc/ml in Austria and 300 000 ufc/ml in the Federal Republic of Germany (1.1.1993 to 31.03.2000).

3.3.2 CRITICAL EVALUATION

3.3.2.1 Relationship to reference method

In numerous papers the relationship between the results of the different Bactoscan versions are published (2, 7, 8, 20). In the following only results with Bactoscan 8000 will be dealt with (20).

3.3.2.1.1. Accuracy - determined by the addition of known microorganisms (bacteria, yeasts, moulds) into pasteurized milk. Accuracy is expressed by the addition of known microorganisms (bacteria, yeasts, moulds) into pasteurized milk. Accuracy is expressed by the addition of known microorganisms (bacteria, yeasts, moulds) into pasteurized milk. Accuracy is expressed by the addition of known microorganisms (bacteria, yeasts, moulds) into pasteurized milk.

Figure 3.3.3 shows the relationship between the results of the different Bactoscan versions (the linear and cubic regression lines together with the linear regression line and the residual standard deviation for the total material) (data were log transformed).

Considering the position of the regression line in relation to the scattergram, it is reasonable that the scattergram shows a deviation in the linear and cubic regression lines.

The determination of the area of the colony counts, which is the relation between the relation of both methods, can be expressed by a linear function and also which transform the reference or official method can be replaced by the relative method can be expressed in all cases of the scattergram.

3.3.2.1.2. Precision - expressed by the addition of known microorganisms (bacteria, yeasts, moulds) into pasteurized milk. Precision is expressed by the addition of known microorganisms (bacteria, yeasts, moulds) into pasteurized milk.

3.3.2.1.3. Linearity - expressed by the addition of known microorganisms (bacteria, yeasts, moulds) into pasteurized milk. Linearity is expressed by the addition of known microorganisms (bacteria, yeasts, moulds) into pasteurized milk.

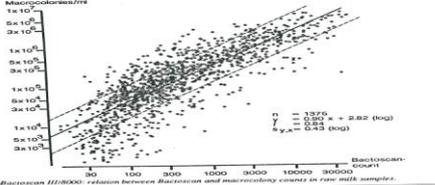


Figure 3.3.3: Bactoscan 8000 relation between Bactoscan and micrococci counts in raw milk samples.

FIL-IDF 256:1991 con Bactoscan Technique di G. Shuren, J. Reichmuth e W. Heesch

Il conteggio dei batteri morti e le polemiche (sterili?)
Quali batteri crescono nel PCA ?
Come si separano i batteri aggregati nel PCA?
L'uso del conservante (batteriostatico/battericida)



qualcuno prende una decisione, ma non mancano le critiche

La conversione lineare (Grappin)

$\log(\text{REF}) = -0.1519 \cdot (\log(\text{BS}))^2 + 2.3921 \cdot \log(\text{BS}) - 3.2313$ - (BS) - 3.2313
with a residual standard deviation $S_{y,x}$ equal to 0.2765 log CFU/ml.

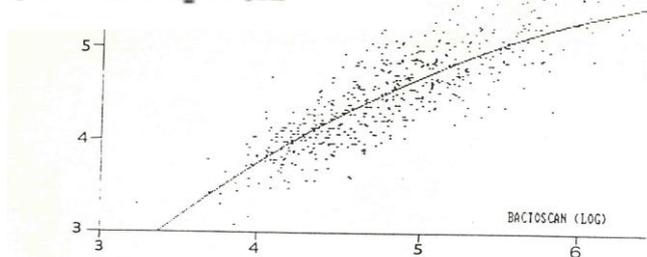


Fig 4. Quadratic regression for determination of the calibration equation in BactoScan 8000



Microbiologi contro «Lattologi»
*la Scienza, la Norma, la Tradizione contro
il bilancio costo-beneficio*

I pragmatici tedeschi fanno la scelta più ovvia, in
Italia si utilizzano 3-4 conversioni diverse
(poi moltiplicatesi ulteriormente)



Il rinascimento *rinnovamento e un po' di speranza*



BACTOSCAN FC (FOSS) e BACTOCOUNT
(BENTELY)

La prima Conversione «ufficiale»
G. Shuren e le prime ipotesi sui tanti
fattori che la possono condizionare

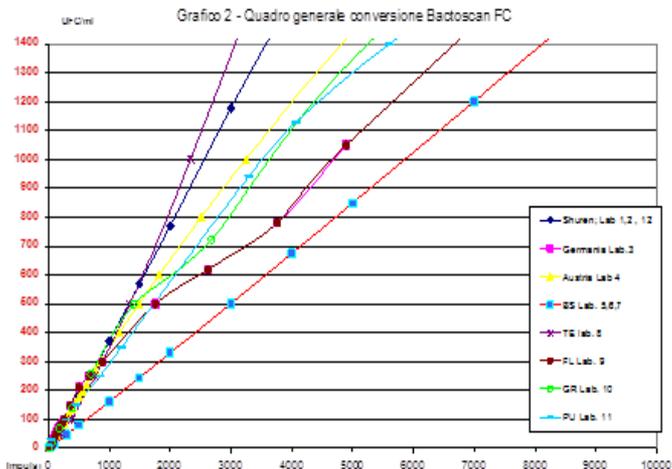
La Conversione «IZSLER Brescia»



Inutile illudersi , meglio
standardizzare gli errori



In Italia ogni Comune ...un campanile



Bolzoni G., Marcolini A., Varisco G., 2000 Evaluation of the Bactoscan FC. 1. Accuracy, comparison with Bactoscan 8000 and somatic cells effect. *Milchwissenschaft- M.S.Int.*, (2), Februar 2000, 67-70

Bolzoni G., Marcolini A., Varisco G., 2001 Evaluation of Bactoscan FC. Second Part: Stability, Linearity, Repetability and Carry-over. *Milchwissenschaft- M. S. Int.*, (56), n° 6 June, p. 318-321

Bolzoni G, Marcolini A., 2001

Bactoscan FC: prestazioni e utilizzo a fianco del Bactoscan 8000 *Il Latte*, 26 (10), p. 136-14

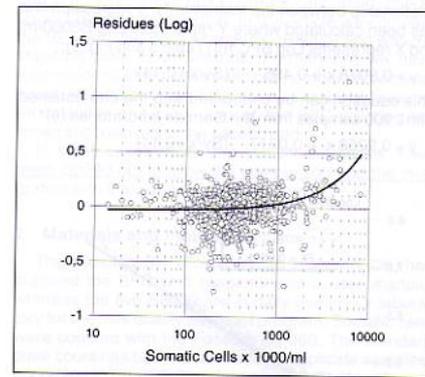
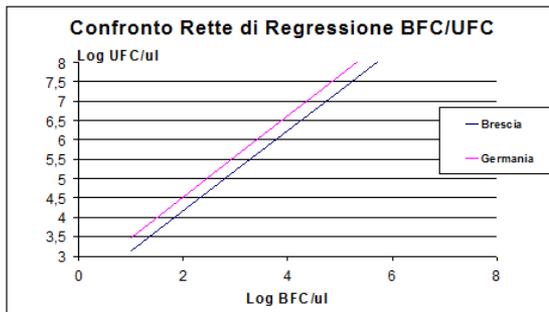
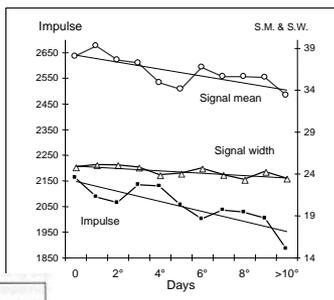
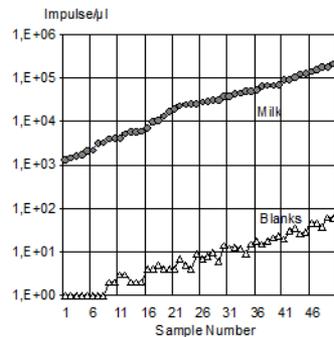
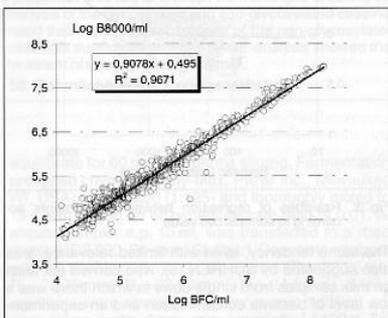


Fig. 2: Residues of regression between Log BFC/ul and Log UFC/ul



...ma in Europa , non va meglio



Battaglie sempre più spietate

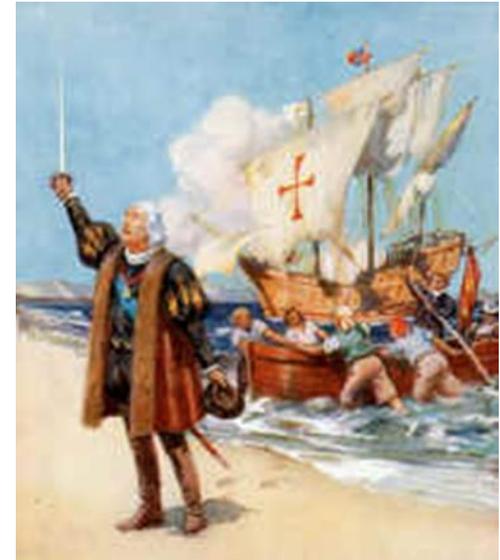
IL CONCETTO DI CONVERSIONE GEOGRAFICA
un buon compromesso ed una grossa perplessità

Norme ISO (derivazione da metodi chimici)

Accreditamento e Sistemi Qualità
(la Conversione appare come un «mutante»)

REG CE e Media Geometrica (aggiungiamo un ulteriore
differenziazione con le modalità di conteggio)

Autocontrollo e Lab. Privati
(costo degli strumenti rispetto al numero di campioni)





.....la grande guerra



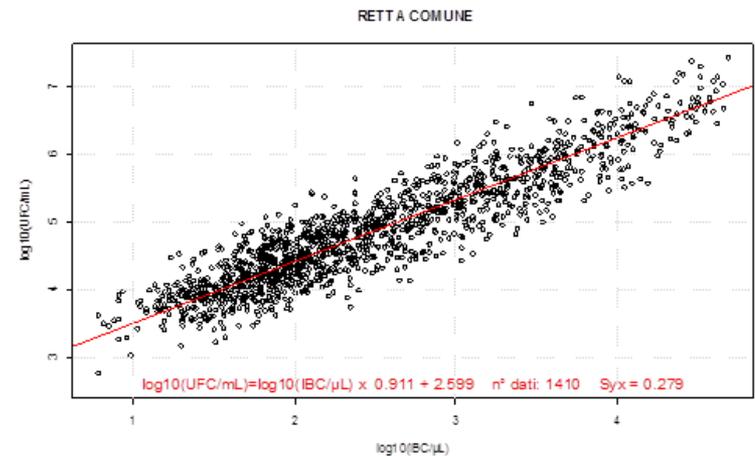
Il progetto «unificazione» del 2008

(16 Lab italiani IZS + ARA + Privati)



Bolzoni G. , Marcolini A. (2010) -
Bactoscan FC – project for unified conversion line in Italy (S.C.) –
Milk science International (Milchwissenschaft) , 65, 3, 309-310

Bolzoni G, Marcolini A, (2010)
Carica batterica totale nel latte crudo : progetto di unificazione della
conversione dei dati in Italia .
Scienza e Tecnica Lattiero Casearia , 61 (5) ,313-324





Secondo passo nel 2010



RETTA UNICA NAZIONALE (30 lab. italiani pubblici e privati)

Il Ruolo dell' I.S.S.
Accredia e Ministero

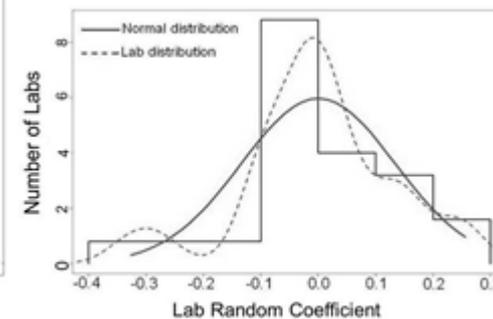
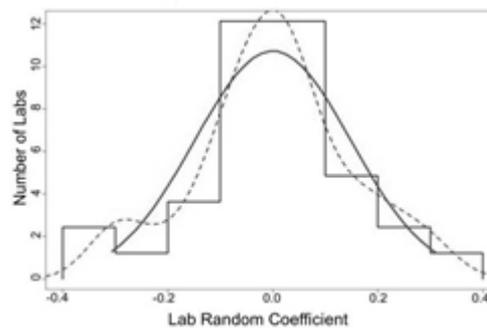
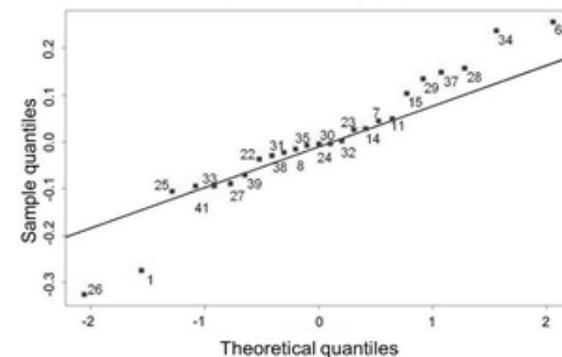
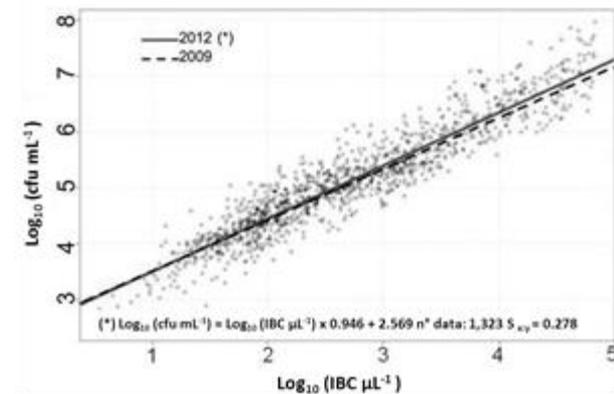
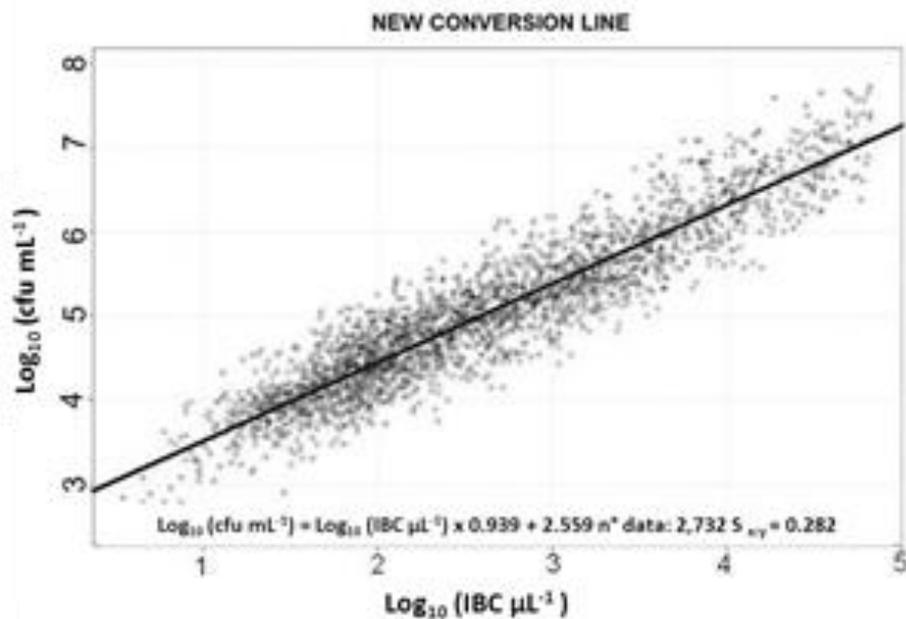
IL NOSTRO PUNTO DI FORZA :
non abbiamo semplicemente «messo insieme»
coppie di risultati , ma ne abbiamo fatto
un'analisi statisticamente sostenibile e
finalizzata ad un preciso scopo «pratico» che
comprende la valutazione delle differenze
sistemiche (del latte o del laboratorio che
esegue il metodo di riferimento?)

IL NOSTRO PUNTO DI DEBOLEZZA :
Numero dei Laboratori da coordinare e da
«controllare»





G. Bolzoni , A. Marcolini , G. Delle Donne , B. Appicciafuoco and A.M. Ferrini (2015)- New Italian conversion line for the enumeration of total bacteria in raw milk with Bactoscan FC. Italian Journal of food science , n2, Vol 7, 2015,



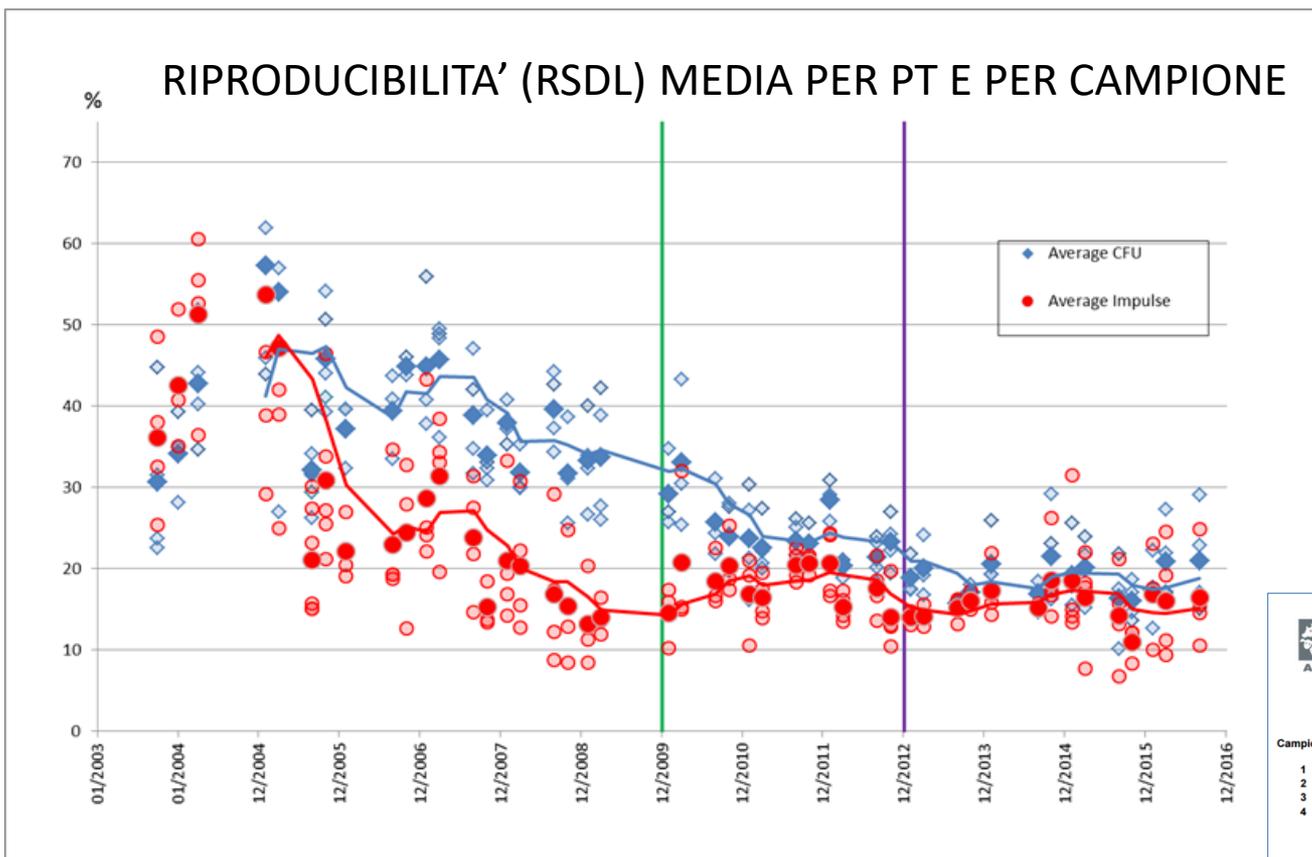


effetto pratico



Bactoscan FC national conversion in Italy: reproducibility of TBC four years after its implementation

Authors: G. Bolzoni¹, A. Marcolini¹, T. Fontana², L. Monaco², A.M. Ferrini³



Prossima pubblicazione su :

Euroreference Magazine, produced jointly by a group of agencies from several Member States of the European Union. Euroreference is a European journal created by ANSES in 2009

RING TEST CARICA BATTERICA TOTALE APRILE 2009

RIPETIBILITA' - RIPRODUCIBILITA' - OUTLIERS CFU/ml

A.I.A.

Campione	Lab. Utili	Media	r	R	Sr	SR	RSDr	RSDR	RSDL
1	31	19,7	4,5	24,0	1,6	8,5	8,0	43,0	42,3
2	32	65,4	6,0	72,1	2,1	25,5	3,2	39,0	38,8
3	29	1005,8	52,3	743,0	18,5	262,5	1,8	26,1	26,0
4	31	1393,4	69,4	1095,7	24,5	387,2	1,8	27,8	27,7

MEDIE GENERALI

Media	r	R	Sr	SR	RSDr	RSDR	RSDL	r/R
621,1	43,6	663,0	15,4	234,3	3,7	34,0	33,7	0,1



Situazione attuale e prospettive future



In ambito **Nazionale** la situazione è decisamente solida e consolidata, sia dal punto di vista tecnico che formale tenuto conto del numero di laboratori interessati

Manca uno studio di correlazione Bactoscan / Bactocount

E' in dirittura d'arrivo un progetto simile per il latte ovi-caprino (ISS/IZSLT)

In ambito **Comunitario** apparentemente e formalmente la situazione è QUASI UGUALE ;

In sostanza invece si sono persi 5 anni !!

L'approccio del Lab. Com. Ref. e il Working-Group ed il progetto mai nato, anche se già considerato maggiorenne, della «Conversione Comunitaria»

Esigenze diverse , finalità diverse ma anche senso pratico vs formalismo e, non ultimo, gli effetti di una disputa commerciale

Se un errore grande deve comunque essere commesso..... perché preoccuparsi degli errori minimi (e non gestibili dal punto di vista pratico ed operativo) meglio sarebbe ridurre/standardizzare quello grande



... allo stato attuale



Laboratory for Food Safety
Maisons-Alfort location



EURL MMP
European Union Reference Laboratory
for Milk and Milk Products
<http://eurl-milk.anses.fr>

European harmonisation of conversion equations between instrumental methods (flow cytometers) and reference method for the determination of total flora in raw cow's milk

Technical report

As this study may be of interest for current standardisation works, EURL MMP will transmit the outcome of this study to IDF/ISO Standing Committee on Statistics and Automation, and to its Project Group S11 "Revision of ISO 21187|IDF 196:2004" and Project Group S13 "Provision of background material to indicate the need to apply a potential conversion equation for quantitative determination of bacteriological quality in milk".

Report Harmonisation CF TF raw milk

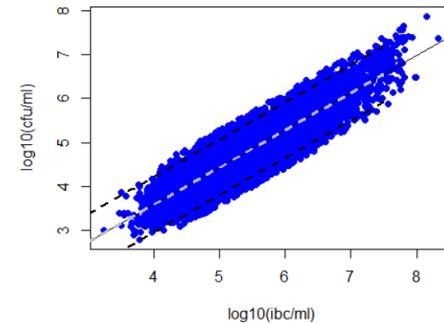


Figure 18. Confidence interval (---), predictive interval at 95%(-.-) of the unified conversion line (—) for EURL/NRLs MMP dataset.

Table 4. Characteristics of the unified conversion equation between reference and IBC methods

Parameters	Unified EURL MMP model			Bentley 2013		
	Estimate	Confidence interval [2,5% ; 97,5 %]		Estimate	Confidence interval [2,5% ; 97,5 %]	
Number of data		14413			Number of data	
Slope	α	0.850	[0.842 ; 0.857]		0.9677	
Intercept	β	0.185	[0.148 ; 0.223]		0.3566	
Residual standard deviation	σ	0.32			0.32	
Coefficient of determination	r^2	0.79			0.81	



In teoria dovrebbe succedere che....



Report Harmonisation CF TF raw milk

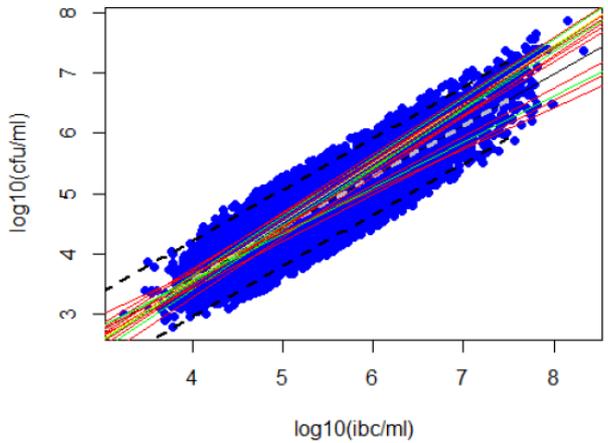


Figure 19. Confidence interval (---), predictive interval at 95%(---) of the unified conversion line (—) for EURL/NRLs MMP dataset and comparison to national conversion lines for Bactoscan FC (red), Bactoscan 8000 (yellow) and national conversion lines for Bactocount (green)

$$I = \frac{\text{number}(cfu_u - cfu_s > 0)}{\text{number}(cfu_u - cfu_s < 0)} - 0.5 \quad (3)$$

This was done for IBC ranges presented in Table 5. When *I* is positive (see equation 3), results estimated by the unified equation are superior to results estimated by national equations.

Table 5. *I* values calculated per country

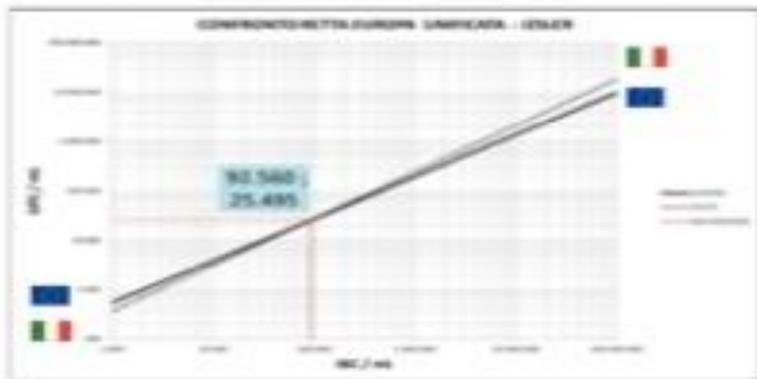
Country	<i>I</i> (%)
Belgium	+20.31
France	+9.36
The Netherlands	+7.33
Italy	-7
Bulgaria	-22
Germany S	-9.33
Germany C	+3.83
Ireland S	+13.34
Ireland C	-9.48
Croatia S	-12.69
Poland S	-12.99
Poland C	+ 7.69
Spain S	-19.62
Switzerland S	+5.05
Switzerland S8	-1.03
Switzerland C	-5.5
Slovenia	-8.81



In pratica potrebbe succedere che



Common conversion vs Italian conversion



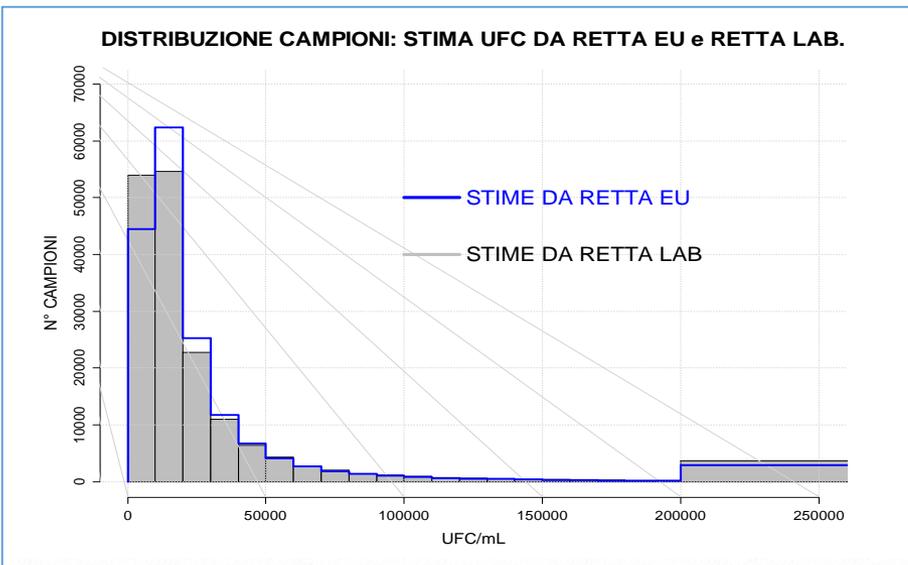
Italian Comment to the technical report:

“European harmonisation of conversion equations between instrumental methods (flow cytometers) and reference method for the determination of total flora in raw cow’s milk”

Giuseppe Bolzoni - Anna Maria Ferrini
CNRQLB- NRL milk



WG on harmonization of conversion factors for total flora of raw milk
EURL-MMP Maisons-Alfort 2016.10.05



A.M.Ferrini - ISS

05/10/2016



Perplessità condivise
da almeno altri 4 Paesi



Personal Opinion

...un compromesso prevede errori ed incertezze in ogni caso..... se il compromesso si basa su dati scientifici seri e solidi diventa più accettabile altrimenti.....



Investigation on Conditioning Factors



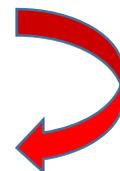
Preventive selection of «specific samples » for each factor



Precise characterization of each single sample



Statistical significance of each single factor



How to manage this factor in daily lab routine ?

Scientific Research

Practical, Commercial, Legal study

COMMON CONVERSION

How to manage eventual **great changes** in **single** countries ?
step by step introduction



Representativity of Data
outliers selection
Field of application (Linearity)

Production of a **COMMON CONVERSION**



routine samples, typical for different geographic area , **well defined standardized procedures** (especially for Ref. Method)



Selection of "valid data"
Instrumental Repetability & Linearity
Reference Method (Plates and Dilutions)

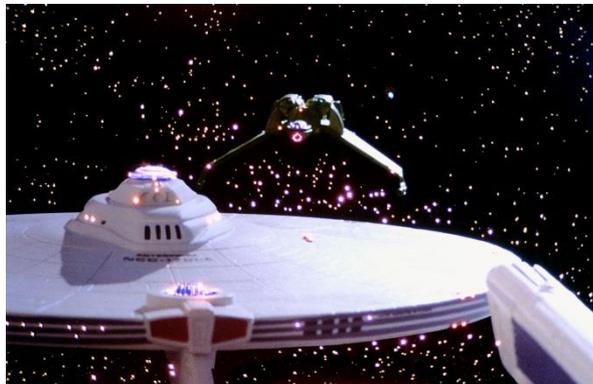


Selection of **invalid results**
Lab's effect evaluation
systematic errors for the 2 methods
Comparison of $S_{Y:X}$, Normality



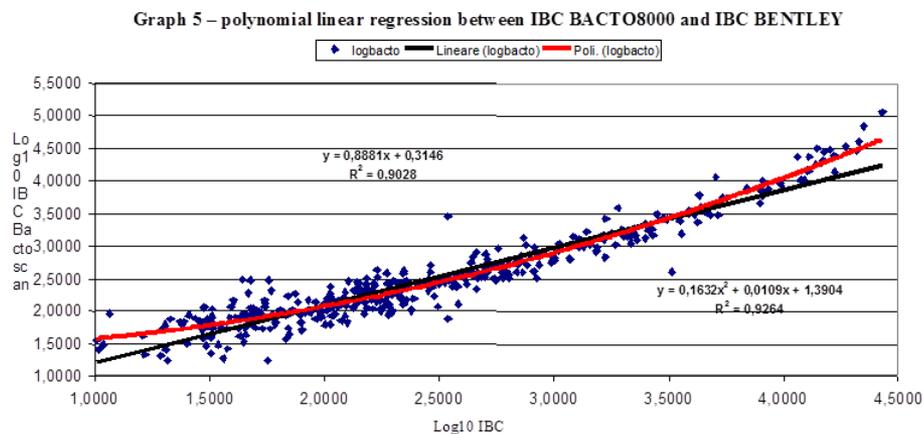


Se c'è ancora tempo.....la mia proposta «alternativa»



1- Confronto strumenti

valutazione correlazione Impulsi BSC vs BCI ed eventuale indice di conversione (un solo Lab, campioni di diversa origine e composizione) ; già eseguito ma non pubblicato con B 8000





2- Confronto Metodo di Riferimento vs Metodo Alternativo

Anche in due soli Lab. ma con latte di diversa origine e composizione (Comunitaria)

Elevata numerosità dei campioni , procedimento standardizzato per l'analisi

Netta prevalenza di campioni attorno a 100.000 UFC/ml



DA EVITARE INVECE : assemblamento di rette di conversione di diversa origine e modalità di produzione statistica !

DEFINIZIONE DI UN UNICO FATTORE UFFICIALE DI EQUIVALENZA RELATIVO AL VALORE DEL LIMITE NORMATIVO PER LA VALUTAZIONE DELLA MEDIA GEOMETRICA



Se c'è ancora tempo.....la mia proposta «alternativa»



I Laboratori Europei esprimono gli esiti in Impulsi
(con eventuale fattore di correzione x strumento)

Gli esiti analitici vengono utilizzati come tali (Impulsi)
per pagamento qualità, autocontrollo, etc.
(aumenta la «accuratezza del dato»)

**LA MEDIA GEOMETRICA CALCOLATA IN IMPULSI
VIENE INVECE CONFRONTATA
(\neq CONFORME / NON CONFORME)
CON IL FATTORE UNICO COMUNITARIO DI
EQUIVALENZA A 100.000 UFC/ml**



Come andò a finire.....



... e finalmente anch'io riuscii ad andare in pensione

