



ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE ABRUZZO E MOLISE "G. Caporale" - TERAMO (Italia)

Rapporto di sintesi

VALIDAZIONE DEL METODO

“FOOD SYSTEM: sistema per la ricerca e l’identificazione presuntiva
di germi patogeni da alimenti”

Listeria monocytogenes

secondo ISO 16140:2003 “ Microbiology of food and animal feedingstuffs –
Protocol for the validation of alternative methods”

Lo studio è stato realizzato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
ABRUZZO e MOLISE "G. Caporale"
Via Campo Boario
64100 – TERAMO
(Italia)

per:

LIOFILCHEM s.r.l.
Via Scozia, Zona Industriale
64026 – ROSETO degli ABRUZZI (TE)
(Italia)

Metodo da validare

FOOD SYSTEM: sistema per la ricerca e l'identificazione presuntiva di germi patogeni da alimenti

Metodo di riferimento

ISO 11290-1:1996 Microbiology of food and animal feedingstuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: detection method.
ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 Modification of the isolation media and haemolysis test and inclusion of precision data.

Metodo di riferimento utilizzato per la validazione

ISO 16140 :2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods

Campo di applicazione

Prodotti carnei
Prodotti lattiero-caseari

INDICE

1.INTRODUZIONE.....	4
1.1 Metodo di riferimento.....	4
1.2 Metodo da validare.....	4
1.2.1 Principio.....	4
1.2.2 Campo di applicazione.....	5
1.2.3 Protocollo di analisi.....	5
2. STUDIO COMPARATIVO DEI METODI.....	5
2.1 Accuratezza relativa, specificità relativa e sensibilità relativa.....	5
2.1.1 Selezione dei campioni	5
2.1.2 Campioni contaminati naturalmente.....	6
2.1.3 Campioni contaminati artificialmente.....	6
2.1.4 Risultati.....	6
2.1.5 Calcolo di AC, SE e SP.....	6
2.1.6 Calcolo dei limiti di confidenza.....	7
2.1.7 Analisi dei dati discordanti.....	8
2.2 Livello di rilevazione relativo.....	8
2.2.1 Selezione dei campioni.....	8
2.2.2 Esecuzione delle prove.....	8
2.2.3 Risultati.....	8
2.3 Selettività.....	9
2.3.1 Selezione dei campioni.....	9
2.3.2 Risultati.....	10
3. CONCLUSIONI.....	10
Allegato 1.....	12
Allegato 2.....	13
Allegato 3.....	14
Allegato 4A.....	17
Allegato 4B.....	19
Allegato 5.....	21
Allegato 6A.....	22
Allegato 6B.....	23
ACRONIMI.....	24
DEFINIZIONI.....	25
RIFERIMENTI.....	26

1. INTRODUZIONE

Obiettivo di questo lavoro è il confronto di un metodo di screening per la ricerca di *Listeria sp* con un metodo di riferimento riconosciuto eseguito secondo i criteri previsti dalla ISO 16140:2003 "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods". Le caratteristiche di entrambi i metodi sono riportati nei punti successivi.

1.1 Metodo di riferimento

Come riferimento nello studio di validazione è stato utilizzato il metodo ISO 11290-1:1996 "Microbiology of food and animal feeding stuff - Horizontal method for detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method" + Amd 1:2004 "Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data"

I risultati sono espressi come "presente" in caso di riscontro di *Listeria monocytogenes*, "assente" in caso contrario

Lo schema del metodo di riferimento è riportato in "Allegato 1".

1.2 Metodo da validare

Il metodo da validare è il "FOOD SYSTEM: sistema per la ricerca e l'identificazione presuntiva di germi patogeni da alimenti".

Il sistema è in grado di rilevare una serie di microrganismi patogeni (*Listeria*, *Salmonella*, *Proteus spp*, *Providencia spp*, *Pseudomonas spp.*, *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, lieviti e muffe).

La validazione riguarda solo la ricerca di *Listeria sp*.

I risultati sono espressi come "positivo" in caso di riscontro di *Listeria monocytogenes*, "negativo" in caso contrario.

La validazione riguarda la ricerca di *Listeria monocytogenes*.

Lo schema del metodo da validare è riportato in "Allegato 2".

1.2.1 Principio

Il metodo si basa su un sistema costituito da una piastrina a 24 pozzetti contenenti terreni colturali con substrati biochimici essiccati. La sospensione iniziale del campione, dopo incubazione a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 h. viene distribuita in aliquote da 0,2 ml in tutti i pozzetti della piastrina che successivamente viene incubata a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 h.

La presenza di microrganismi patogeni viene evidenziata dal viraggio di colore dei vari pozzetti.

In particolare, la presenza di *Listeria sp* viene rilevata dal viraggio al nero del pozzetto "10-LIS" e dalla reazione positiva nel pozzetto "11-CAT" dopo l'aggiunta di perossido di idrogeno.

In caso di esito positivo si procede alla conferma culturale per *Listeria monocytogenes* secondo quanto previsto nella ISO 11290-1:1996 + Amd 1:2004.

1.2.2 Campo di applicazione

Il metodo da validare è applicabile ai prodotti carnei, ittici, lattiero-caseari ed altri generi di alimenti. La validazione viene limitata alle categorie riferibili a prodotti carnei ed ai prodotti lattiero-caseari

1.2.3 Protocollo di analisi

La ricerca di *Listeria monocytogenes* con il metodo da validare è stata eseguita come di seguito descritto, conformemente alle indicazioni fornite dalla ditta produttrice:

- preparazione della sospensione iniziale
- arricchimento in Acqua Peptonata Tamponata incubato a 36 ± 1 °C per 18- 24 h
- semina nei pozzetti del sistema e incubazione a 36 ± 1 °C per 18-24
- lettura dei risultati sulla base del viraggio dei pozzetti e della prova della catalasi

In caso di positività il pozzetto "10 LIS" vira al nero e nel pozzetto "11CAT" c'è sviluppo di bollicine di aria dopo aggiunta di perossido di idrogeno. Il risultato deve essere poi confermato secondo quanto previsto nella ISO 11290-1:1996. Si preleva, quindi, un'ansata della brodocoltura dal pozzetto "10 LIS" seminando una piastra di A.L.O.A. agar e una di un secondo terreno selettivo (Oxford o Palcam agar).

2. STUDIO COMPARATIVO DEI METODI

La comparazione del metodo da validare con quello di riferimento è stata effettuata secondo i criteri definiti dalla norma ISO 16140:2003 "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods" per i metodi qualitativi.

I parametri di validazione considerati sono i seguenti: accuratezza relativa (AC), sensibilità relativa (SE), specificità relativa (SP), livello di rilevabilità e selettività.

2.1 Accuratezza relativa, specificità relativa e sensibilità relativa

Per definire i valori di accuratezza relativa, specificità relativa e sensibilità relativa sono stati elaborati i risultati ottenuti da analisi eseguite con entrambi i metodi su campioni naturalmente o artificialmente contaminati con *Listeria monocytogenes* e su campioni risultati negativi per lo stesso microrganismo.

2.1.1 Selezione dei campioni

Sono stati analizzati in totale 148 campioni di alimenti, di cui 76 prodotti carnei e 72 prodotti lattiero-caseari, distribuiti secondo quanto riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Campioni analizzati

Categoria	Prodotto	N. campioni positivi		N. campioni negativi
		NC	AC	
Prodotti carnei	salsiccia	2	---	---
	salame	4	---	20
	muscolo pollo	6	4	24
	carne pollo conf.	---	16	---
	prosciutto crudo	---	---	2
Prodotti lattiero-caseari	gorgonzola	1	---	3
	camembert	1	---	20
	caciotta	29	---	18

Legenda: NC = campioni naturalmente contaminati; AC= campioni artificialmente contaminati

2.1.2 Campioni contaminati naturalmente

I campioni contaminati naturalmente sono stati scelti casualmente tra quelli già analizzati in laboratorio per *Listeria monocytogenes*.

2.1.3 Campioni contaminati artificialmente

Per raggiungere il numero di campioni necessari per la valutazione statistica dei parametri scelti, sono stati utilizzati anche campioni contaminati artificialmente.

La preparazione degli inoculi e la determinazione dei livelli di contaminazione sono descritti nella Istruzione Operativa "Preparazione di campioni artificialmente contaminati" (Allegato 3).

2.1.4 Risultati

I risultati delle prove eseguite sono riportati nell'Allegato 4, i risultati del confronto tra i due metodi nelle Tabelle 2-3, la valutazione complessiva è riportata nella Tabella 4, completata dai valori dei limiti di confidenza nelle Tabelle 5 e 6.

Tabella 2. Concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di riferimento ed il metodo alternativo - prodotti carnei

		METODO DI RIFERIMENTO		
		presente	assente	totale
METODO ALTERNATIVO	positivo	28	0	28
	negativo	4	44	48
	totale	32	44	76

Tabella 3. Concordanza tra i risultati ottenuti con il metodo di riferimento ed il metodo alternativo – prodotti lattiero-caseari

		METODO DI RIFERIMENTO		
		presente	assente	totale
METODO ALTERNATIVO	positivo	30	1	31
	negativo	1	40	41
	totale	31	41	72

2.1.5 Calcolo di AC, SE e SP

Considerando il numero dei risultati positivi e negativi ottenuti esaminando i campioni con il metodo alternativo e quello di riferimento, sono stati calcolati i parametri di AC, SE e SP nel modo seguente:

$$- AC = \frac{(CP + CN)}{N} \times 100\%$$

$$- SE = \frac{CP}{N +} \times 100\%$$

$$- SP = \frac{CN}{N -} \times 100\%$$

Tabella 4. Prospetto riassuntivo dei dati per il calcolo dell'Accuratezza relativa (AC), Sensibilità relativa (SE) e Specificità relativa (SP)

Categoria	CP	CN	DN	DP	N	AC%	N+	SE%	N-	SP%
Prodotti carnei	28	44	0	4	69	94,7	32	87,5	48	100
Prodotti lattiero-caseari	30	40	1	1	72	97,2	31	96,8	41	97,6

Legenda: CP=concordanza positiva; CN=concordanza negativa; DN=deviazione negativa; DP=deviazione positiva; N=numero totale dei campioni (CN + CP + DP + DN); N+=numero totale dei risultati positivi ottenuti con il metodo di riferimento (CP + DN); N-=numero totale dei risultati negativi ottenuti con il metodo di riferimento (CN + DP).

2.1.6 Calcolo dei limiti di confidenza

Rispetto ai singoli parametri, sono stati inoltre calcolati i valori dei limiti di confidenza riportati nelle Tabelle 5 e 6.

Tabella 5. Limiti di confidenza per SE,SP,AC : prodotti carnei

	Valore	I.c.i.	I.c.s.
Se	87,5	71,8%	94,9%
Sp	100,0%	93,6%	100,0%
Ac	94,7%	87,2%	97,9%

Legenda: I.c.i. = limite inferiore di confidenza; I.c.s. = limite superiore di confidenza

Tabella 6. Limiti di confidenza per SE,SP,AC : prodotti lattiero-caseari

	Valore	I.c.i.	I.c.s.
Se	96,8%	83,8%	99,2%
Sp	97,6%	89,2%	97,6%
Ac	97,2%	90,5%	99,1%

Legenda: I.c.i. = limite inferiore di confidenza; I.c.s. = limite superiore di confidenza

2.1.7 Analisi dei dati discordanti

I dati discordanti nei campioni carnei sono stati valutati con il test statistico di Mc Nemar, utilizzando i numeri di Deviazioni Positive (DP) e Deviazioni Negative (DN) riscontrate per categoria di alimento esaminato (Tabelle 7 e 8)

Tabella 7. Analisi dei dati discordanti: campioni carnei

Mc Nemar	
Chi quadro	2,25
p-value	0,134

Tabella 8. Analisi dei dati discordanti: campioni lattiero-caseari

Mc Nemar	
Chi quadro	0,5
p-value	0,479

Il test di Mc Nemar utilizzato è equivalente a quello riportato nell'Allegato F della ISO 16140:2003.

2.2 Livello di rilevazione relativo

2.2.1 Selezione dei campioni

Lo studio statistico del livello di rilevazione relativo è stato realizzato contaminando i campioni appartenenti alle 2 categorie di alimenti (prodotti carnei e prodotti lattiero-caseari) con diversi livelli di concentrazione di *Listeria monocytogenes* (Tabella 9) ed utilizzando un campione non contaminato come controllo, secondo l'Istruzione operativa "Preparazione di campioni artificialmente contaminati" riportata in Allegato 3.

2.2.2 Esecuzione delle prove

Ciascuna combinazione campione/microrganismo target per livello di contaminazione è stata analizzata sei volte con il metodo da validare e quello di riferimento. I campioni sono stati contaminati con i ceppi elencati in Allegato 5.

2.2.3 Risultati

I risultati relativi ai livelli di contaminazione sono riportati in Tabella 9, le percentuali di positività ottenute per ogni livello di contaminazione considerato in Tabella 10.

I valori relativi al limite più basso del livello di rilevazione relativo riferito a ciascuna categoria di alimento sono riportati in Tabella 11.

Tabella 9. Livelli di contaminazione

Categorie di prodotti	Livelli di contaminazione	Metodo di riferimento	Metodo da validare
Prodotti carnei	0 ufc/g	---	---
Prodotti carnei	5 ufc/g	(2 – 4 ufc/g)	---
Prodotti carnei	10 ufc/g	(9 – 13 ufc/g)	(7 – 12 ufc/g)
Prodotti carnei	100 ufc/g	(96 –119 ufc/g)	(95 –120 ufc/g)
Prodotti carnei	1000 ufc/g	(1030-1140 ufc/g)	(1010 -1150 ufc/g)
Prodotti lattiero-caseari	0 ufc/g	---	---
Prodotti lattiero-caseari	5 ufc/g	(3 – 8 ufc/g)	---
Prodotti lattiero-caseari	10 ufc/g	(8 – 12 ufc/g)	---
Prodotti lattiero-caseari	50 ufc/g	(48 – 59 ufc/g)	(45 – 61 ufc/g)
Prodotti lattiero-caseari	100 ufc/g	(95-122 ufc/g)	(93-125 ufc/g)
Prodotti lattiero-caseari	1000 ufc/g	(930 –1180 ufc/g)	(930 –1150 ufc/g)

Tabella 10. Percentuale di campioni positivi rilevata con le due metodiche per livello di contaminazione

Categorie di prodotti	Livelli di contaminazione	Percentuale di positività	
		Metodo di riferimento	Metodo da validare
Prodotti carnei	0 ufc/g	0%	0%
Prodotti carnei	5 ufc/g	40%	0%
Prodotti carnei	10 ufc/g	100%	83%
Prodotti carnei	100 ufc/g	100%	100%
Prodotti carnei	1000 ufc/g	100%	100%
Prodotti lattiero-caseari	0 ufc/g	0%	0%
Prodotti lattiero-caseari	5 ufc/g	40%	0%
Prodotti lattiero-caseari	10 ufc/g	100%	0%
Prodotti lattiero-caseari	50 ufc/g	100%	33%
Prodotti lattiero-caseari	100 ufc/g	100%	67%
Prodotti lattiero-caseari	1000 ufc/g	100%	100%

Tabella 11 : Livello di rilevazione relativo

Categorie di prodotti	Livello di contaminazione (ufc/g)
Prodotti carnei	5 - 10
Prodotti lattiero-caseari	50 - 100

2.3 Selettività

2.3.1 Selezione dei campioni

La Selettività è stata realizzata contaminando i campioni appartenenti alle 2 categorie di alimenti con ceppi di *Listeria monocytogenes* (ceppo target) e ceppi di altre specie batteriche (ceppi non target). I ceppi utilizzati provenivano in parte dalla banca ceppi dell' Istituto Zooprofilattico (IZS) isolati da alimenti e caratterizzati ed in parte da collezioni internazionali (American Type Culture Collection – ATCC e National Collection of Type Culture - NCTC)

I campioni sono stati contaminati secondo l'Istruzione Operativa "Protocollo di preparazione di campioni artificialmente contaminati" (Allegato 3).

2.3.2 Risultati

Il metodo da validare è stato in grado di rilevare i ceppi di *Listeria monocytogenes* inoculati benché presenti in sospensioni in cui erano presenti anche microrganismi non target utilizzati come interferenti. I risultati delle prove di selettività sono riportati in dettaglio negli Allegati 6 e 7.

Relativamente al confronto tra i livelli di selettività tra i due metodi, i risultati sono stati riportati nelle Tabelle 12-13 e 14.

Tabella 12. Confronto dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento ed il metodo alternativo (prodotti carnei)

		METODO DI RIFERIMENTO		
		presente	assente	totale
METODO DA VALIDARE	positivo	35	0	35
	negativo	0	20	20
	totale	35	20	55

Tabella 13.:Confronto dei risultati ottenuti con il metodo di riferimento ed il metodo alternativo (prodotti lattiero-caseari)

		METODO DI RIFERIMENTO		
		presente	assente	totale
METODO DA VALIDARE	positivo	35	0	35
	negativo	0	20	20
	totale	35	20	55

Tabella 14:Limite di confidenza dei valori della selettività rilevati

Categorie di alimento	Selettività	I.c.i.	I.c.s.
Prodotti carnei	100,0%	90,3%	100,0%
Prodotti lattiero-caseari	100,0%	90,3%	100,0%

3. CONCLUSIONI

Visti i risultati ottenuti, il confronto del metodo da validare “FOOD SYSTEM: sistema per la ricerca e l’identificazione presuntiva di germi patogeni da alimenti” con il metodo di riferimento “ISO 11290-1:1996 Microbiology of food and animal feedingstuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: detection method. – Geneve + ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 Modification of the isolation media and haemolysis test and inclusion of precision data” permette di concludere che :

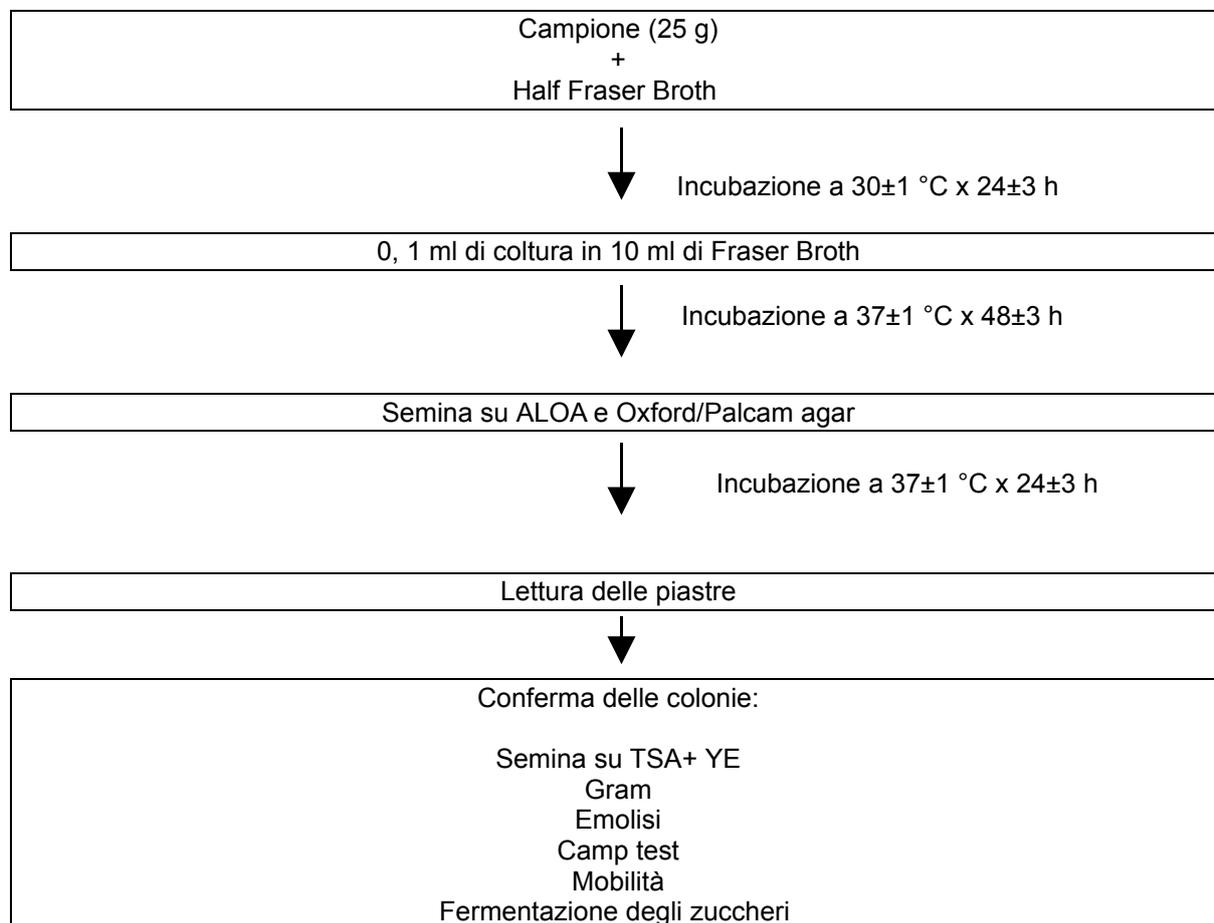
- L’analisi dei dati discordanti, sia per la categoria “prodotti carnei” che per quella relativa ai “prodotti lattiero-caseari” non ha rilevato una differenza statisticamente significativa tra i due metodi . Secondo quanto evidenziato nelle tabelle 7 e 8 il valore di p-value è risultato < 0,05 che è il limite soglia per entrambe le categorie di prodotti.
- Il valore di sensibilità relativa, specificità relativa ed accuratezza relativa sono risultati superiori a quelli del metodo di riferimento. (Tabella 15).

Tabella 15. Confronto risultati metodo da validare e metodo di riferimento

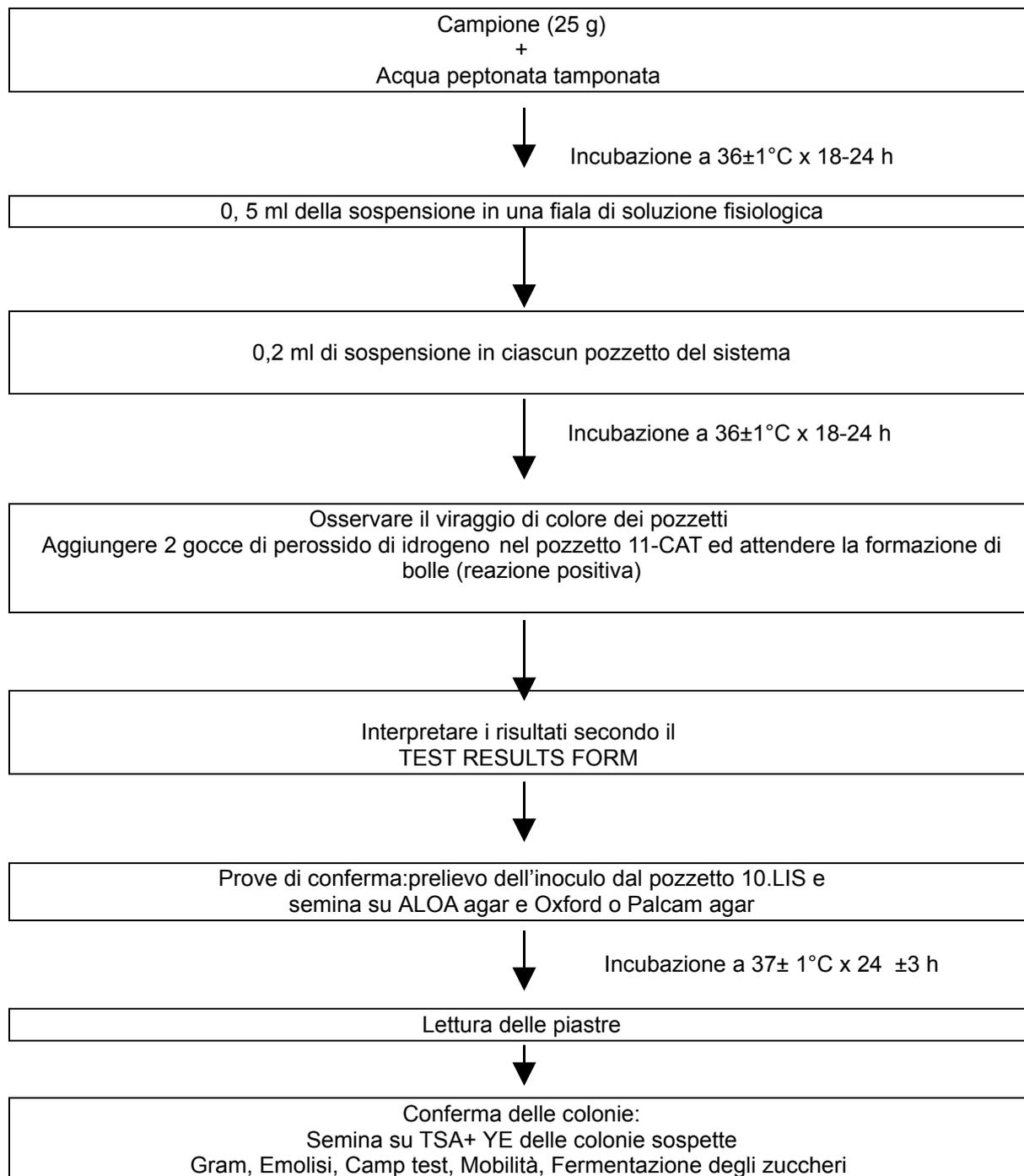
Parametri	Metodo da validare		Metodo di riferimento
	Prodotti carnei	Prodotti lattiero-caseari	
SE	87,5%	96,8%	85,2%
SP	100%	97,6%	97,4%
AC	94,7%	97,2%	88,7%

- I dati riguardanti il livello di rilevazione relativo riportati nella tabella 11 sono confrontabili con quelli del metodo di riferimento, indicato nel lavoro pubblicato da Scotter S.L. et al (2001) e corrispondenti a valori compresi tra 5 e 100 ufc/g.
- Come riassunto nella tabella 14, il metodo FOOD SYSTEM riconosce *Listeria monocytogenes* sia nei prodotti carnei che nei prodotti lattiero-caseari con valori di selettività pari al 100%.

**Diagramma di flusso del protocollo analitico del metodo di riferimento
"ISO 11290-1:1996"**



**Diagramma di flusso del protocollo analitico del metodo da validare
"FOOD SYSTEM"**



ISTRUZIONE OPERATIVA
PREPARAZIONE DI CAMPIONI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI
(Listeria monocytogenes)

1. SCOPO

Questa Istruzione operativa indica tutte le attività necessarie per la preparazione di campioni artificialmente contaminati con *Listeria monocytogenes* (ceppo target) o altri microrganismi (ceppi non target), da utilizzare nel protocollo di validazione del kit "FOOD SYSTEM: sistema per la ricerca e l'identificazione presuntiva di germi patogeni da alimenti"

2. TERMINI E DEFINIZIONI

Sono riportate in "Progetto Validazione kit: protocollo per la determinazione qualitativa di *Listeria monocytogenes*".

3. RIFERIMENTI

International Organization for Standardization. ISO 4833:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganism - Colony count technique at 30 degrees C. Geneva.

Validazione kit :protocollo per la determinazione qualitativa di *Listeria monocytogenes*

Validazione kit: piano operativo per la determinazione di Accuratezza relativa, Sensibilità relativa, Specificità relativa.

Validazione kit: piano operativo per la determinazione del Livello di Rilevazione.

Validazione kit: piano operativo per la determinazione della Selettività.

4. MODALITA' OPERATIVE

4.1 Selezione, preparazione e caratterizzazione dei ceppi batterici

4.2 Preparazione dell'inoculo per *Listeria spp*

- a. Prendere un liofilo di *Listeria monocytogenes* ,ricostituire con 1 ml di BHI Broth (C25) e incubare per 24 h a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- b. Seminare un'ansata della brodocoltura su una piastra di Agar Sangue (C17) ed incubare per 48 h a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- c. Trascorso il periodo di incubazione, trasferire una colonia dalla piastra di agar sangue in una provetta contenente 10 ml di BHI Broth (C25) e incubare per 24 h a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- d. Mantenere la sospensioni in agitazione orbitale per le fasi di allestimento delle diluizioni (bagnomaria con acqua a T° inferiore a 10°C) e per tutta la fase di verifica della concentrazione o di stoccaggio temporaneo tra le fasi operative;

- e. Verificare la concentrazione della sospensione allo spettrofotometro (600 nm) per avere una OD pari a $0,101 \pm 0,005$ (corrispondente a una sospensione batterica di circa $1,6 \times 10^8$ UFC/ml) e al nefelometro una trasmittanza al 81%. Se necessario diluire con Acqua peptonata (AP) sterile;
- f. Parallelamente, titolare la brodocoltura seguendo quanto previsto nella ISO 4833:2003;
- g. Preparare cinque provette contenenti 4,5 ml di AP;
- h. Dalla provetta madre trasferire 0,5 ml della sospensione in una provetta contenente 4,5 ml di AP (10^7);
- i. Da quest'ultima provetta (10^7), dopo omogeneizzazione, trasferire 0,5 ml in una provetta contenente 4,5 ml di AP (10^6);
- j. Da quest'ultima provetta (10^6), dopo omogeneizzazione, trasferire 0,5 ml in una provetta contenente 4,5 ml di AP (10^5);
- k. Da quest'ultima provetta (10^5), dopo omogeneizzazione, trasferire 0,5 ml in una provetta contenente 4,5 ml di AP (10^4);
- l. Da quest'ultima provetta (10^4), dopo omogeneizzazione, trasferire 0,5 ml in una provetta contenente 4,5 ml di AP (10^3);
- m. Da quest'ultima provetta (10^3), dopo omogeneizzazione, trasferire 0,5 ml in una provetta contenente 4,5 ml di AP (10^2);
- n. Effettuare dalle diluizioni 10^2 , 10^3 , 10^4 una conta seminando in doppio 0,1 ml di ogni diluizione in TSA al sangue, incubare per 20-24h a 37°C ;
- o. Mantenere le sospensioni refrigerate fino al momento dell'uso.

4.3 Accuratezza relativa, Sensibilità relativa, Specificità relativa

- a. Preparare un numero di campioni corrispondente alle necessità operative;
- b. Per ogni campione trasferire in un idoneo contenitore di plastica sterile 25 ± 0.5 g di campione prelevato secondo le modalità previste in IZSTEB3.1.2SOP001;
- c. Inoculare i campioni con 1 ml della sospensione preparata del ceppo di *Listeria monocytogenes* alla concentrazione di 10^2 ;
- d. Procedere alle analisi secondo le procedure riportate al punto 4: RIFERIMENTI;
- e. Nel caso vengano utilizzati materiali di riferimento, seguire le indicazioni della ditta fornitrice:

Esempio:

- Bio Ball™ : - aggiungere un singolo Tip BioBall nel brodo di prearricchimento
- Mescolare
 - Incubare secondo quanto richiesto dalle procedure

4.4 Livello di rilevazione

- a. Preparare un numero di campioni corrispondente alle necessità operative;
- b. Per ogni campione trasferire in un idoneo contenitore di plastica sterile 25 ± 0.5 g di campione prelevato secondo le modalità previste in IZSTEB3.1.2SOP001;
- c. Inoculare i campioni con 1 ml della sospensione preparata del ceppo di *Salmonella* spp ai seguenti livelli di concentrazione, ottenuto seguendo il protocollo riportato al punto 5.2;

Livello	Concentrazione ufc/ml
0	negativo
1	5-10
2	50-100
3	100-200

- d. Procedere alle analisi secondo le procedure riportate al punto 4: RIFERIMENTI.

4.5 Selettività

- a. Preparare un numero di campioni corrispondente alle necessità operative;
- b. Per ogni campione trasferire in un idoneo contenitore di plastica sterile 25 ± 0.5 g di campione prelevato secondo le modalità previste in IZSTEB3.1.2SOP001;
- c. Preparare il ceppo di *Listeria monocytogenes* alla concentrazione di 10^2 seguendo quanto indicato al punto 5.2;
- d. Preparare i ceppi non target alla stessa concentrazione, seguendo quanto indicato al punto 5.2;
- e. Inoculare i campioni con 1 ml della sospensione preparata del ceppo di *Listeria monocytogenes* e dei ceppi non target predisposti;
- f. Procedere alle analisi secondo le procedure riportate al punto 4: RIFERIMENTI;
- g. Nel caso vengano utilizzati materiali di riferimento, seguire le indicazioni della ditta fornitrice;
- h. Incubare secondo quanto richiesto dalle procedure.

Tabella dei risultati

Sensibilità relativa, Specificità relativa, Accuratezza relativa

Prodotti carnei

N.	data	NRG/NRR	Matrice	Metodo di riferimento	Metodo da validare
1	5/3/07	3251/393	salsiccia	presente	negativo
2	19/3/07	4032/489	salsiccia	presente	negativo
3	19/3/07	4038/495	salame	presente	positivo
4	16/4/07	5418/687	salame	presente	positivo
5	16/4/07	5427/696	muscolo pollo	presente	negativo
6	14/5/07	6290/844	muscolo pollo	presente	positivo
7	14/5/07	6290/844	muscolo pollo	presente	positivo
8	14/5/07	6290/844	muscolo pollo	presente	positivo
9	14/5/07	6290/844	muscolo pollo	presente	positivo
10	14/5/07	6290/844	muscolo pollo	presente	positivo
11	14/5/07	6860/845	muscolo pollo	presente	positivo
12	14/5/07	6860/845	muscolo pollo	presente	positivo
13	14/5/07	6860/845	muscolo pollo	presente	positivo
14	14/5/07	6860/845	muscolo pollo	presente	positivo
15	14/5/07	6860/845	muscolo pollo	presente	positivo
16	14/5/07	6859/846	muscolo pollo	presente	negativo
17	14/5/07	6858/847	muscolo pollo	presente	positivo
18	14/5/07	6857/848	muscolo pollo	presente	positivo
19	19/3/07	4033/490	salame	assente	negativo
20	19/3/07	4034/491	salame	assente	negativo
21	19/3/07	4035/492	salame	assente	negativo
22	19/3/07	4036/493	salame	assente	negativo
23	19/3/07	4037/494	salame	assente	negativo
24	19/3/07	4039/496	salame	assente	negativo
25	19/3/07	4040/497	salame	assente	negativo
26	19/3/07	4041/498	salame	assente	negativo
27	26/3/07	4378/554	salame	assente	negativo
28	16/4/07	5416/685	Prosciutto crudo	assente	negativo
29	16/4/07	5419/688	muscolo pollo	assente	negativo
30	16/4/07	5420/689	muscolo pollo	assente	negativo
31	16/4/07	5421/690	muscolo pollo	assente	negativo
32	16/4/07	5422/691	muscolo pollo	assente	negativo
33	16/4/07	5423/692	muscolo pollo	assente	negativo
34	16/4/07	5424/693	muscolo pollo	assente	negativo
35	16/4/07	5425/694	muscolo pollo	assente	negativo
36	16/4/07	5426/695	muscolo pollo	assente	negativo
37	16/4/07	5428/697	muscolo pollo	assente	negativo
38	27/4/07	6052/748	muscolo pollo	assente	negativo
39	27/4/07	6053/749	muscolo pollo	assente	negativo
40	27/4/07	6054/750	muscolo pollo	assente	negativo

N.	data	NRG/NRR	matrice	Metodo di riferimento	Metodo alternativo
41	19/3/07	4033/490	carne pollo conf	presente	positivo
42	19/3/07	4034/491	carne pollo conf.	presente	positivo
43	19/3/07	4035/492	carne pollo conf	presente	positivo
44	19/3/07	4036/493	carne pollo conf.	presente	positivo
45	19/3/07	4033/490	carne pollo conf	presente	positivo
46	19/3/07	4034/491	carne pollo conf.	presente	positivo
47	19/3/07	4035/492	carne pollo conf	presente	positivo
48	19/3/07	4036/493	carne pollo conf.	presente	positivo
49	19/3/07	4033/490	carne pollo conf	presente	positivo
50	19/3/07	4034/491	carne pollo conf.	presente	positivo
51	19/3/07	4035/492	carne pollo conf	presente	positivo
52	19/3/07	4036/493	carne pollo conf.	presente	positivo
53	19/3/07	4034/491	carne pollo conf	presente	positivo
54	19/3/07	4035/492	carne pollo conf.	presente	positivo
55	19/3/07	4063/494	salame	assente	negativo
56	19/3/07	4063/494	salame	assente	negativo
57	19/3/07	4063/494	salame	assente	negativo
58	19/3/07	4063/494	salame	assente	negativo
59	19/3/07	4063/494	salame	assente	negativo
60	19/3/07	4063/494	salame	assente	negativo
61	19/3/07	4063/494	salame	assente	negativo
62	19/3/07	4063/494	salame	assente	negativo
63	26/3/07	4063/494	salame	assente	negativo
64	16/4/07	5416/693	Prosciutto crudo	assente	negativo
65	16/4/07	5465/718	muscolo pollo	assente	negativo
66	16/4/07	5465/718	muscolo pollo	assente	negativo
67	16/4/07	5465/718	muscolo pollo	assente	negativo
68	16/4/07	5465/718	muscolo pollo	assente	negativo
69	16/4/07	5465/718	muscolo pollo	assente	negativo
70	16/4/07	5465/718	muscolo pollo	assente	negativo
71	16/4/07	5465/718	muscolo pollo	assente	negativo
72	16/4/07	5465/718	muscolo pollo	assente	negativo
73	16/4/07	5465/718	muscolo pollo	assente	negativo
74	27/4/07	5465/718	muscolo pollo	assente	negativo
75	27/4/07	5465/718	muscolo pollo	assente	negativo
76	27/4/07	5465/718	muscolo pollo	assente	negativo

Tabella dei risultati

Sensibilità relativa, Specificità relativa, Accuratezza relativa

Prodotti lattiero-caseari

N.	data	NRG/NRR	matrice	Metodo di riferimento	Metodo da validare
1	19/3/07	4042/499	gorgonzola	presente	negativo
2	26/3/07	4385/547	caciotta	presente	positivo
3	26/3/07	4384/548	caciotta	presente	positivo
4	26/3/07	4376/552	camembert	presente	positivo
5	27/4/07	6055/751	caciotta	presente	positivo
6	27/4/07	6056/752	caciotta	presente	positivo
7	27/4/07	6057/753	caciotta	presente	positivo
8	27/4/07	6058/754	caciotta	presente	positivo
9	27/4/07	6059/755	caciotta	presente	positivo
10	27/4/07	6060/756	caciotta	presente	positivo
11	27/4/07	6061/757	caciotta	presente	positivo
12	27/4/07	6062/758	caciotta	presente	positivo
13	27/4/07	6063/759	caciotta	presente	positivo
14	27/4/07	6064/760	caciotta	presente	positivo
15	27/4/07	6065/761	caciotta	presente	positivo
16	27/4/07	6066/762	caciotta	presente	positivo
17	27/4/07	6067/763	caciotta	presente	positivo
18	27/4/07	6068/764	caciotta	presente	positivo
19	27/4/07	6068/764	caciotta	presente	positivo
20	14/5/07	6856/849.1	caciotta	presente	positivo
21	14/5/07	6856/849.2	caciotta	presente	positivo
22	14/5/07	6856/849.3	caciotta	presente	positivo
23	14/5/07	6856/849.4	caciotta	presente	positivo
24	14/5/07	6856/849.5	caciotta	presente	positivo
25	19/3/07	4043/500	camembert	assente	positivo
26	19/3/07	4044/501	camembert	assente	negativo
27	19/3/07	4045/502	camembert	assente	negativo
28	19/3/07	4046/503	camembert	assente	negativo
29	19/3/07	4047/504	camembert	assente	negativo
30	26/3/07	4389/542	camembert	assente	negativo
31	26/3/07	4388/543	caciotta	assente	negativo
32	26/3/07	4387/544	caciotta	assente	negativo
33	26/3/07	4375/545	camembert	assente	negativo
34	26/3/07	4386/546	caciotta	assente	negativo
35	26/3/07	4383/549	crescenza	assente	negativo
36	26/3/07	4382/550	caciotta	assente	negativo
37	26/3/07	4377/555	asiago	assente	negativo
38	16/4/07	5417/686	asiago	assente	presente
39	16/4/07	5429/698	camembert	assente	negativo
40	16/4/07	5430/699	camembert	assente	negativo
41	16/4/07	5431/700	camembert	assente	negativo
42	16/4/07	5432/701	camembert	assente	negativo
43	16/4/07	5433/702	camembert	assente	negativo
44	16/4/07	5434/703	camembert	assente	negativo
45	16/4/07	5435/704	camembert	assente	negativo

N.	data	NRG/NRR	matrice	Metodo di riferimento	Metodo da validare
46	16/4/07	5436/705	camembert	assente	negativo
47	16/4/07	5437/706	camembert	assente	negativo
48	16/4/07	5438/707	camembert	assente	negativo
49	16/4/07	5439/708	camembert	assente	negativo
50	16/4/07	5440/709	camembert	assente	negativo
51	16/4/07	5441/710	camembert	assente	negativo
52	27/4/07	6055/751	caciotta	assente	negativo
53	27/4/07	6056/752	caciotta	assente	negativo
54	27/4/07	6057/753	caciotta	assente	negativo
55	27/4/07	6058/754	caciotta	assente	negativo
56	27/4/07	6059/755	caciotta	assente	negativo
57	27/4/07	6060/756	caciotta	assente	negativo
58	27/4/07	6061/757	caciotta	assente	negativo
59	27/4/07	6062/758	caciotta	assente	negativo
60	27/4/07	6063/759	caciotta	assente	negativo
61	27/4/07	6064/760	caciotta	assente	negativo
62	27/4/07	6065/761	caciotta	assente	negativo
63	27/4/07	6066/762	caciotta	assente	negativo
64	27/4/07	6067/763	caciotta	assente	negativo
65	27/4/07	6068/764	caciotta	assente	negativo
66	30/10/07	17760/1693.1	caciotta	presente	positivo
67	30/10/07	17760/1693.2	caciotta	presente	positivo
68	30/10/07	17760/1693.3	caciotta	presente	positivo
69	30/10/07	17760/1693.4	caciotta	presente	positivo
70	30/10/07	17760/1693.5	caciotta	presente	positivo
71	30/10/07	17760/1693.6	caciotta	presente	positivo
72	30/10/07	17760/1693.7	caciotta	presente	positivo

Livello di contaminazione: ceppi batterici utilizzati

Ceppo batterico	Id. di riferimento*	Matrice di isolamento
<i>L. monocytogenes</i>	4967	gorgonzola
<i>L. monocytogenes</i>	5751	muscolo pollo
<i>L. monocytogenes</i>	1185	taleggio
<i>L. monocytogenes</i>	6186	taleggio
<i>L. monocytogenes</i>	3440	brie
<i>L. monocytogenes</i>	893	arrostiticini
<i>L. monocytogenes</i>	892	muscolo pollo
<i>L. monocytogenes</i>	894	muscolo pollo

Legenda: Id di riferimento = Numero identificativo interno

Selettività : Risultati delle prove con ceppi batterici target

Ceppo batterico	Id. di riferimento	Matrice di isolamento	Risultati	
			Metodo di riferimento	Metodo da validare
<i>L. monocytogenes</i>	4967	gorgonzola	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	4745	gorgonzola	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	3821	gorgonzola	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	5751	muscolo pollo	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	1185	taleggio	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	6186	taleggio	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	3440	brie	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	6494	salmone	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	6742	salmone	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	5751	gorgonzola	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	893	arrosticini	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	892	muscolo pollo	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	894	muscolo pollo	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	816	muscolo pollo	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	677	muscolo pollo	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	678	muscolo pollo	positivo	negativo
<i>L. monocytogenes</i>	679	muscolo pollo	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	713	muscolo suino	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	714	muscolo suino	positivo	negativo
<i>L. monocytogenes</i>	715	muscolo suino	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	716	Carne pollo conf.	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	717	Carne pollo conf.	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	718	Carne pollo conf.	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	719	Carne pollo conf.	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	6832	salsiccia	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	6831	salsiccia	positivo	negativo
<i>L. monocytogenes</i>	6830	salsiccia	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	6829	carne fresca	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	6828	muscolo pollo	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	6837	Carne pollo conf.	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	6836	Carne pollo conf.	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	6835	Carne pollo conf.	positivo	negativo
<i>L. monocytogenes</i>	6839	muscolo pollo	positivo	positivo
<i>L. monocytogenes</i>	6840	Carne pollo conf.	positivo	negativo
<i>L. monocytogenes</i>	6835	Carne pollo conf.	positivo	negativo

Selettività :risultati delle prove con ceppi batterici non target

Ceppo batterico	Id. di riferimento	Matrice di isolamento	Risultato
<i>B. cereus</i>	ATCC 11778	-	negativo
<i>B. subtilis</i>	ATCC 6633	-	negativo
<i>L. innocua</i>	1014	caciotta	negativo
<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	-	negativo
<i>E. faecium</i>	7295	caciotta	negativo
<i>E. faecalis</i>	ATCC 29212	-	negativo
<i>M. luteus</i>	ATCC 9341	-	negativo
<i>H. alvei</i>	7298	caciotta	negativo
<i>S. lentus</i>	6152	caciotta	negativo
<i>L. ivanovii</i>	ATCC 19119	-	negativo
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	-	negativo
<i>Y. enterocolitica</i>	ATCC 19543	-	negativo
<i>S. aureus</i>	ATCC 25923	-	negativo
<i>C. albicans</i>	5195	caciotta	negativo
<i>R. equi</i>	ATCC 31543	-	negativo
<i>S. epidermidis</i>	6129	caciotta	negativo
<i>S. aureus</i>	7234	muscolo pollo	negativo
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 12378	-	negativo
<i>B. stearothermophilus</i>	ATCC 24567	-	negativo
<i>E. coli</i>	7343	Caciotta	negativo
<i>S. aureus</i>	7343	Caciotta	negativo

ACRONIMI

AC	Accuratezza relativa
AMD	Amendment (Emendamento – proposta di parziale modifica)
ATCC	American Type Culture Collection
CN	Concordanza Negativa
CP	Concordanza positiva
DN	Deviazione negativa
DP	Deviazione positiva
I.C.I.	limite inferiore di confidenza
I.C.S.	limite superiore di confidenza
N	Numero campioni
N+	Numero campioni positivi
N-	Numero campioni negativi
ISO	International Standard Organization (Organizzazione Internazionale di Standardizzazione)
NCTC	National Collection of Type Cultures
SE	Sensibilità relativa
SP	Specificità relativa

DEFINIZIONI

Accuratezza relativa: livello di concordanza tra le risposte ottenute con il metodo di riferimento e quelle ottenute con il metodo alternativo sugli stessi campioni.

Analita: un componente del campione del quale deve essere dimostrata la presenza con l'aiuto di un metodo di analisi; può essere un microrganismo, i suoi componenti o i suoi prodotti.

Deviazione negativa: il metodo alternativo presenta una deviazione negativa se dà un risultato "negativo" dove il metodo di riferimento dà un risultato "positivo"; una deviazione negativa diventa "falso negativo" (FN) quando può essere dimostrato che il risultato vero è "positivo".

Deviazione positiva: il metodo alternativo presenta una deviazione positiva se dà un risultato positivo dove il metodo di riferimento dà un risultato negativo; una deviazione positiva diventa "falso positivo" (FP) quando può essere dimostrato che il risultato vero è "negativo"; una deviazione positiva diventa "vero positivo" (VP) quando può essere dimostrato che il risultato vero è "positivo".

Livello di rilevabilità relativa: corrisponde al più basso valore di microrganismi che è possibile rilevare nel campione, con una probabilità del 50%, con il metodo alternativo e con il metodo di riferimento.

Metodo alternativo: metodo d'analisi che permette di determinare o stimare, per una categoria di alimenti predefinita, lo stesso analita misurato con il metodo di riferimento corrispondente.

Metodo di riferimento: metodo riconosciuto a livello internazionale, ampiamente accettato.

Metodo qualitativo: metodo di analisi in cui la risposta è la presenza o assenza di analita rilevato direttamente o indirettamente in una certa quantità di campione.

Selettività: corrisponde alla misura dell'inclusività (abilità di rilevamento rilevare dell'analita target su tra un'ampia serie di ceppi) e dell'esclusività (assenza di interferenze su da una serie di ceppi non target) del metodo alternativo.

Sensibilità relativa: capacità del metodo da validare di rilevare l'analita dove il metodo di riferimento lo rileva.

Specificità relativa: capacità del metodo da validare di non rilevare l'analita dove il metodo di riferimento non lo rileva.

Studio comparativo dei metodi: studio realizzato dal laboratorio organizzatore che consiste nel confrontare il metodo alternativo con il metodo di riferimento.

Validazione di un metodo alternativo: consiste nel dimostrare, con un determinato livello di confidenza, che i risultati ottenuti con il metodo alternativo sono paragonabili a quelli ottenuti con il metodo di riferimento.

RIFERIMENTI

- International Standard Organisation/ISO 16140. 2003.-Microbiology of food and animal feedingstuffs – Protocol for the validation of alternative methods, 1/5/2003, 81 pp.
- International Standard Organisation/ISO 11290-1. 1996.-Microbiology of food and animal feedingstuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: detection method, 15/12/1996, 21 pp.
- International Standard Organisation/ISO 11290-1. 1996/Amd 1: 2004 Modification of the isolation media and haemolysis test and inclusion of precision data, 15/10/2004, 17 pp.
- Scotter S.L., Langton S., Lombard B., Schulten S., Nagelkerke N., In't Veld PH, Rollier P., Lahellec C. 2001. Validation of ISO method 11290 part I – Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int J Food Microbiol*, **64**, 295-306.