



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”

*Salmonella* spp.

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 6579 - 2002: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp.  
ISO 6579 - 2002 : Technical Corrigendum 1-2004

**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.....	4
1.2.3 Protocollo di analisi.....	4
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
2.1.4 Calcolo di AC, SE e SP.....	7
2.1.5 Calcolo dei limiti di confidenza.....	7
2.1.6 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.....	9
3. CONCLUSIONI.....	10
Allegato 1.....	11
Allegato 2.....	12
Allegato 3.....	13
Allegato 4A.....	16
Allegato 5.....	22
Allegato 6A.....	23
Allegato 6B.....	24
ACRONIMI.....	25
DEFINIZIONI.....	26
RIFERIMENTI.....	27

## 1. INTRODUZIONE

Obiettivo di questo lavoro è il confronto di un metodo di screening per la ricerca di *Salmonella spp* 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 International Standard Organisation ISO 6579: 2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs -Horizontal method for the detection of *Salmonella spp* + Technical Corrigendum 1-2004

I risultati sono espressi come "presente" in caso di riscontro di *Salmonella spp*, "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 la ricerca di *Salmonella spp*.

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

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 essiccati e substrati biochimici. La sospensione iniziale del campione, dopo incubazione a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  per 18-24 h, è 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 *Salmonella spp* viene rilevata dal viraggio al rosso del pozzetto "1-LDC", dal viraggio al nero di "2-H<sub>2</sub>S".

In caso di esito positivo si procede alla conferma colturale per *Salmonella spp* secondo quanto previsto nella ISO 6579:2002

#### 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 *Salmonella spp* 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  $36\pm 1^\circ\text{C}$  per 18- 24 h
- semina nei pozzetti del sistema e incubazione a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  per 18-24h
- lettura dei risultati sulla base del viraggio dei pozzetti

In caso di positività (pozzetto "1-LDC" rosso, "2-H<sub>2</sub>S" nero) il risultato è stato poi confermato secondo quanto previsto nella ISO 6579:2002, prelevando un'ansata della brodocoltura dal pozzetto "1-LDC" per seminare una piastra di XLD agar e una di Rambach agar e continuando secondo quanto previsto nel metodo di riferimento.

## **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 quanto riguarda i metodi qualitativi.

I parametri di validazione considerati sono stati 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 *Salmonella spp* e su campioni negativi per lo stesso microrganismo.

#### **2.1.1 Selezione dei campioni**

Sono stati analizzati in totale 150 campioni di alimenti, di cui 84 prodotti carnei e 66 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	1	16	7
	Salame	---	3	---
	muscolo pollo	---	15	16
	carne pollo confezionati	---	---	5
	Carne macinata	---	---	5
	Muscolo tacchino	---	---	6
	prosciutto crudo	---	10	---
Prodotti lattiero-caseari	Ricotta	5	---	5
	---	---	---	---
	Scamorza di bovino	---	10	---
	Caciotta	---	20	26

**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 *Salmonella spp.*

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

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

		METODO DI RIFERIMENTO		
		presente	assente	totale
METODO ALTERNATIVO	positivo	40	0	40
	negativo	5	39	44
	totale	45	39	84

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	0	30
	negativo	5	31	36
	totale	35	31	66

### 2.1.4 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)

Categorie di prodotti	CP	CN	DN	DP	N	AC%	N+	SE%	N-	SP%
Prodotti carnei	40	39	5	0	84	94,0%	40	88,9%	39	100%
Prodotti lattiero-caseari	30	31	5	0	66	92,4	30	85,7%	31	100%

**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).

### 2.1.5 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	L.C.I.	L.C.S.
Se	88,9%	76,4%	95,1%
Sp	100%	92,8%	100%
Ac	94%	86,8%	97,4%

**Legenda:** L.C.I. = limite inferiore di confidenza; L.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	85,7%	70,5%	93,6%
Sp	100%	91,1%	100%
Ac	92,4%	83,4%	96,6%

Legenda: L.C.I. = limite inferiore di confidenza; L.C.S. = limite superiore di confidenza

### 2.1.6 Analisi dei dati discordanti

I dati discordanti nei campioni carnei e nei campioni lattiero-caseari 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: prodotti carnei

Mc Nemar	
Chi quadro	3,200
p-value	0,074

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

Mc Nemar	
Chi quadro	3,200
p-value	0,074

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 diverse concentrazioni di *Salmonella spp* (Tabella 9) ed utilizzando un campione non contaminato come negativo, 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 sei volte con quello di riferimento.

I campioni sono stati contaminati con un ceppo di *Salmonella enteriditis*.

### 2.2.3 Risultati

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

<i>Categoria di prodotti</i>	<i>Livelli di contaminazione</i>	<i>Metodo da validare</i>	<i>Metodo di riferimento</i>
Prodotti carnei	0 UFC/g	---	---
Prodotti carnei	5 UFC/g	(0 UFC/g)	(0 UFC/g)
Prodotti carnei	10 UFC/g	(8-14 UFC/g)	(8-11 UFC/g)
Prodotti carnei	100 UFC/g	(92-104 UFC/g)	(93-114 UFC/g)
Prodotti carnei	1000 UFC/g	(949 -1150 UFC/g)	(976 -1125 UFC/g)
Prodotti lattiero-caseari	0 UFC/g	---	---
Prodotti lattiero-caseari	5 UFC/g	(0 UFC/g)	(0 UFC/g)
Prodotti lattiero-caseari	10 UFC/g	(8 – 12 UFC/g)	(9 – 13 UFC/g)
Prodotti lattiero-caseari	100 UFC/g	(95-124 UFC/g)	(93-105 UFC/g)
Prodotti lattiero-caseari	1000 UFC/g	(950 –1150 UFC/g)	(975 –1152 UFC/g)

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

<i>Categoria di prodotti</i>	<i>Livelli di contaminazione</i>	<i>Percentuale di positività</i>	
		<i>Metodo di riferimento</i>	<i>Metodo da validare</i>
Prodotti carnei	0 UFC/g	0%	0%
Prodotti carnei	5 UFC/g	0%	0%
Prodotti carnei	10 UFC/g	100%	100%
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	0%	0%
Prodotti lattiero-caseari	10 UFC/g	100%	100%
Prodotti lattiero-caseari	50 UFC/g	100%	100%
Prodotti lattiero-caseari	100 UFC/g	100%	100%
Prodotti lattiero-caseari	1000 UFC/g	100%	100%

Tabella 11. Livello di rilevazione relativo

<i>Categorie di prodotti</i>	<i>Livello di contaminazione (UFC/g)</i>
Prodotti carnei	10 UFC/g
Prodotti lattiero-caseari	10 UFC/g

## 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 *Salmonella spp* (ceppo target) e ceppi di altre specie batteriche (ceppi non target).

I ceppi utilizzati provenivano in parte dalla banca ceppi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise G. Caporale (IZS A&M) isolati da alimenti e caratterizzati e in parte dalle collezioni internazionali American Type Culture Collection (ATCC) e National Collection of Type Cultures (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 *Salmonella spp* 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 6A e 6B. 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	26	0	26
	negativo	0	26	26
	totale	26	26	52

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	26	0	26
	negativo	0	26	26
	totale	26	26	52

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 "FOOD SYSTEM: sistema per la ricerca e l'identificazione presuntiva di germi patogeni da alimenti" con il metodo di riferimento ISO 6579:2002 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. + ISO 6579:2002 - Technical Corrigendum 1:2004 permette di concludere che:

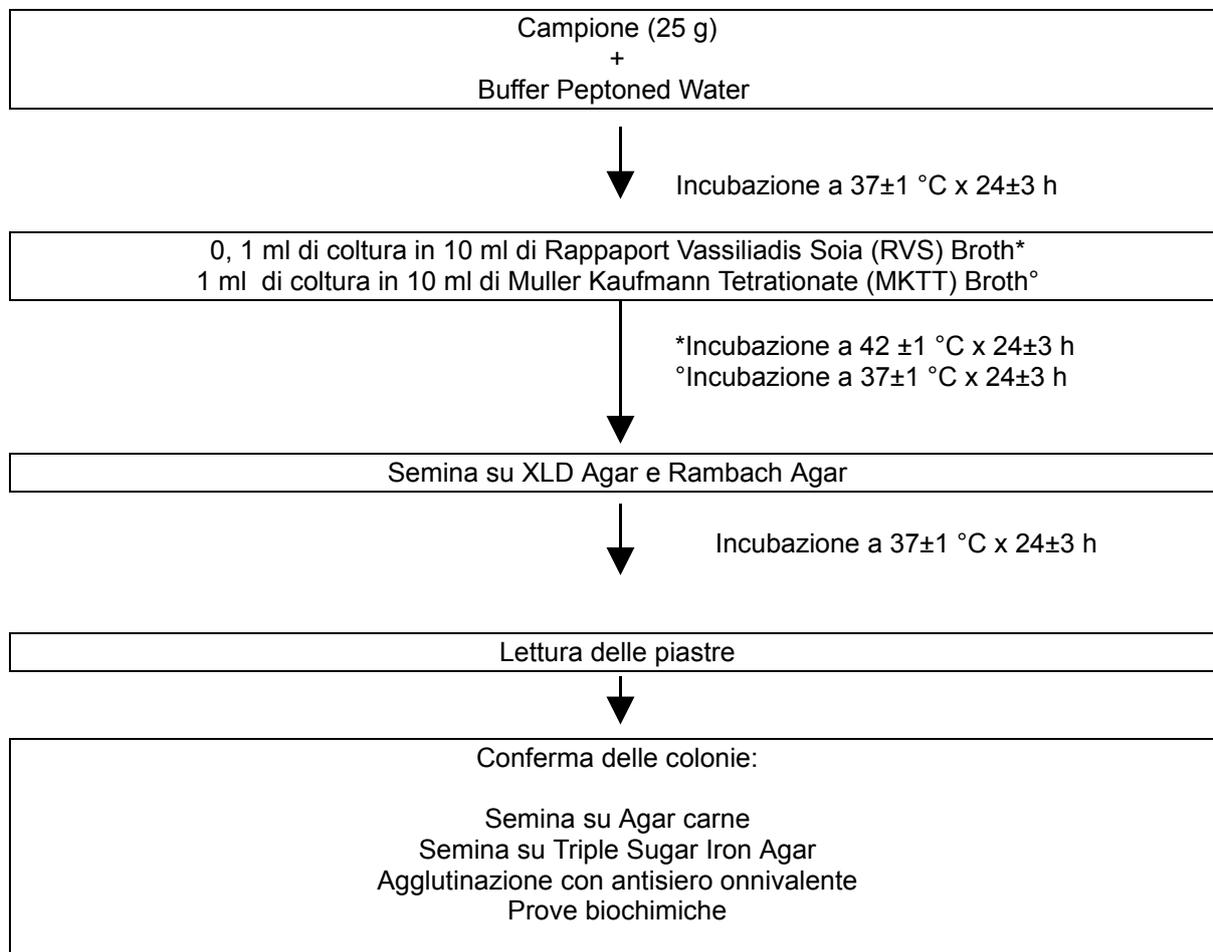
- Il valore di sensibilità relativa è risultato, sia per la categoria "prodotti carnei" che per quella relativa ai "prodotti lattiero-caseari", leggermente inferiore rispetto a quello del metodo di riferimento ( Tabella 15) , ma l'analisi dei dati discordanti , secondo quanto evidenziato nelle tabelle 7 e 8 ha evidenziato un valore di p-value < 0,05 che è il limite soglia per entrambe le categorie di prodotti, per cui i due metodi non possono essere considerati differenti rispetto a questi parametri.
- La specificità relativa ed accuratezza relativa sono invece risultati superiori a quelli del metodo di riferimento (Tabella 15).

Tabella 15. Confronto dei risultati ottenuti con il metodo FOOD SYSTEM e il metodo di riferimento

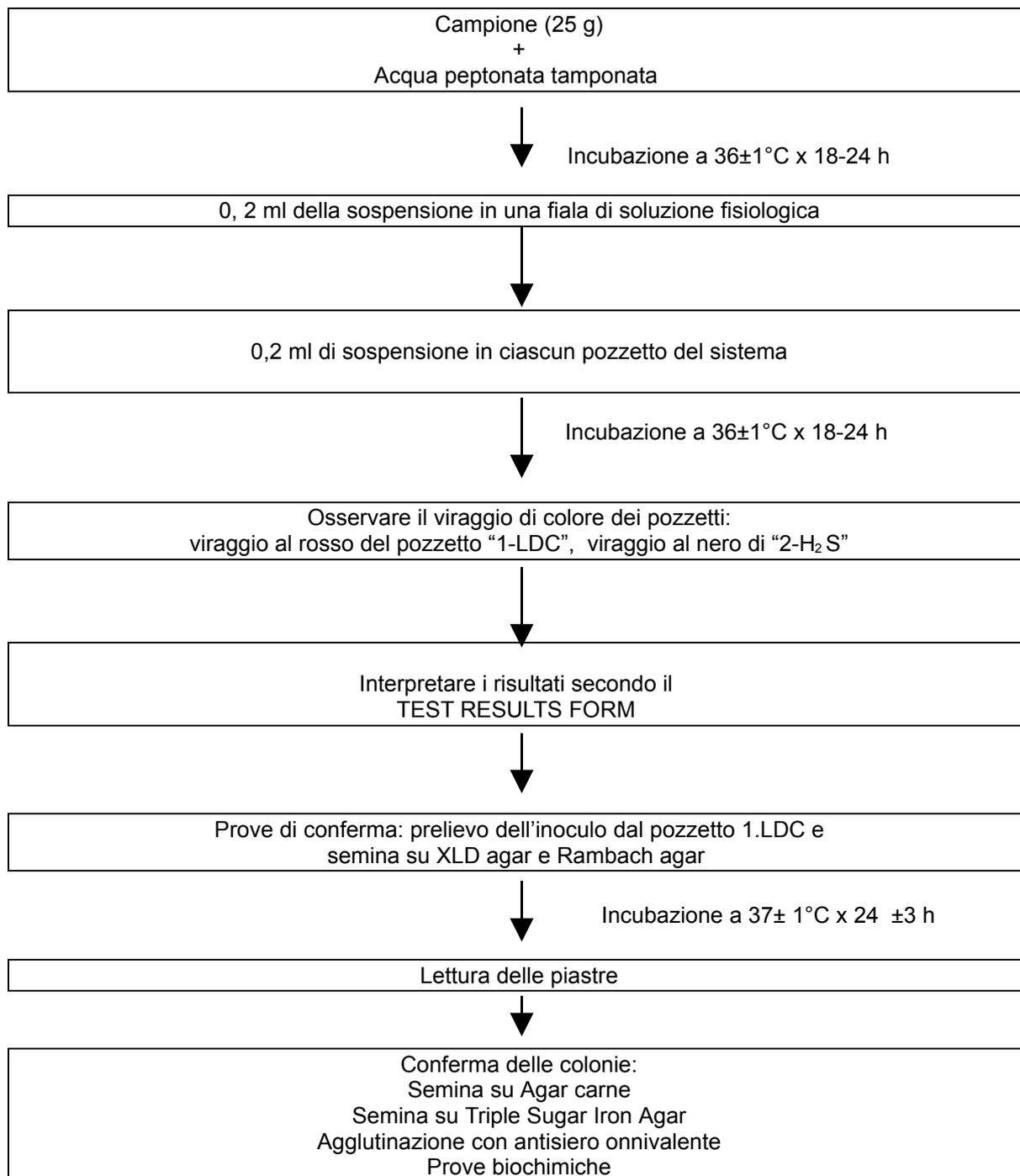
Parametri	Metodo da validare		Metodo di riferimento
	Prodotti carnei	Prodotti lattiero-caseari	
SE	88,9	85,7%	94,4%
SP	100%	100%	88,8%
AC	94%	92,4%	89,1%

- I dati riguardanti il livello di rilevazione relativo riportati nella tabella 11 sono confrontabili con quelli del metodo di riferimento e corrispondente ad un valore di 10 UFC/g.
- Come riassunto nella tabella 14, il metodo FOOD SYSTEM è in grado di riconoscere *Salmonella spp.* 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 6579:2002"**



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



**ISTRUZIONE OPERATIVA**  
**PREPARAZIONE DI CAMPIONI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI**  
*(Salmonella spp.)*

## 1. SCOPO

Questa Istruzione operativa indica tutte le attività necessarie per la preparazione di campioni artificialmente contaminati con *Salmonella spp.* (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 *Salmonella spp.*".

## 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 *Salmonella spp.*
- 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 *Salmonella spp.*

- a. Prendere un liofilo di *Salmonella spp.*,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  $T^{\circ}$  inferiore a  $10^{\circ}\text{C}$ ) 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 (595 nm) per avere una OD pari a  $0,2071 \pm 0,005$  (corrispondente a una sospensione batterica di circa  $1,6 \times 10^8$  UFC/

ml) e al nefelometro una trasmittanza al 65% . 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  $37^\circ\text{C}$ ;
- 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  $25 \pm 0.5$  g di campione;
- c. Inoculare i campioni con 1 ml della sospensione preparata del ceppo di *Salmonella spp.* 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.

#### 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  $25 \pm 0.5$  g di campione;
- 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	100-1000

- 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  $25 \pm 0.5$  g di campione;
- c. Preparare il ceppo di *Salmonella* spp. 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 *Salmonella* spp. 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

	Matrice	NRG	NRR	sede	Metodo di riferimento	Metodo da validare	NC/AC*	Ceppo batterico	Materiale utilizzato
1	muscolo pollo	2384	180/1	TE	presente	positivo	AC	S. hadar	Ceppo di campo
2	muscolo pollo	2384	180/2	TE	presente	positivo	AC	S. infantis	Ceppo di campo
3	muscolo pollo	2384	180/3	TE	presente	positivo	AC	S. virchow	Ceppo di campo
4	muscolo pollo	2384	180/4	TE	presente	positivo	AC	S. enteriditis	Ceppo di campo
5	muscolo pollo	2384	180/5	TE	presente	positivo	AC	S. derby	Ceppo di campo
6	muscolo pollo	3979	361/1	TE	presente	positivo	AC	S. virchow	Ceppo di campo
7	muscolo pollo	3979	361/2	TE	presente	positivo	AC	S. hadar	Ceppo di campo
8	muscolo pollo	3979	361/3	TE	presente	positivo	AC	S. infantis	Ceppo di campo
9	muscolo pollo	3979	361/4	TE	presente	positivo	AC	S. enteriditis	Ceppo di campo
10	muscolo pollo	3979	361/5	TE	presente	positivo	AC	S. virchow	Ceppo di campo
11	Salsiccia suino	5721	493/1	TE	presente	positivo	AC	S. hadar	Ceppo di campo
12	Salsiccia suino	5721	493/2	TE	presente	positivo	AC	S. infantis	Ceppo di campo
13	Salsiccia suino	5721	493/3	TE	presente	positivo	AC	S. enteriditis	Ceppo di campo
14	Salsiccia suino	5721	493/4	TE	presente	positivo	AC	S. infantis	Ceppo di campo
15	Salsiccia suino	5721	493/5	TE	presente	positivo	NC	S. enteriditis	Ceppo di campo
16	muscolo pollo	9751	831	TE	presente	positivo	AC	S. hadar	Ceppo di campo
17	muscolo pollo	9751	831	TE	presente	positivo	AC	S. infantis	Ceppo di campo
18	muscolo pollo	9751	831	TE	presente	positivo	AC	S. virchow	Ceppo di campo
19	muscolo pollo	9751	831	TE	presente	positivo	AC	S. enteriditis	Ceppo di campo
20	muscolo pollo	9751	831	TE	presente	positivo	AC	S. derby	Ceppo di campo
21	prosciutto	9130	782	TE	presente	positivo	AC	S. virchow	Ceppo di campo
22	prosciutto	9130	782	TE	presente	positivo	AC	S. hadar	Ceppo di campo
	Matrice	NRG	NRR	sede	Metodo di riferimento	Metodo da validare	NC/AC*	Ceppo batterico	Materiale utilizzato

23	prosciutto	9130	782	TE	presente	positivo	AC	<i>S. infantis</i>	Ceppo di campo
24	prosciutto	9130	782	TE	presente	positivo	AC	<i>S. enteritidis</i>	Ceppo di campo
25	prosciutto	9130	782	TE	presente	positivo	AC	<i>S. derby</i>	Ceppo di campo
26	prosciutto	8232	710	TE	presente	positivo	AC	<i>S.typhimurium</i>	Bioball
27	prosciutto	8232	710	TE	presente	positivo	AC	<i>S. abaeetuba</i>	Bioball
28	prosciutto	8232	710	TE	presente	positivo	AC	<i>S. typhimurium</i>	Bioball
29	prosciutto	8232	710	TE	presente	positivo	AC	<i>S. salford</i>	Bioball
30	prosciutto	8232	710	TE	presente	positivo	AC	<i>S. typhimurium</i>	Bioball
31	Pancetta	1056	92	PE	presente	negativo	AC	<i>S. virchow</i>	Ceppo di campo
32	Impasto Salame	1057	93	PE	presente	negativo	AC	<i>S. hadar</i>	Ceppo di campo
33	Soppressata	1058	94	PE	presente	negativo	AC	<i>S. infantis</i>	Ceppo di campo
34	Salsiccia suino	1059	95	PE	presente	negativo	AC	<i>S. enteritidis</i>	Ceppo di campo
35	Salsiccia suino	1060	96/1	PE	presente	negativo	AC	<i>S. derby</i>	Ceppo di campo
36	Salsiccia suino	5526	347/1	PE	presente	positivo	AC	<i>S.typhimurium</i>	Bioball
37	Salsiccia suino	5526	347/2	PE	presente	positivo	AC	<i>S. abaeetuba</i>	Bioball
38	Salsiccia suino	5526	347/3	PE	presente	positivo	AC	<i>S. typhimurium</i>	Bioball
39	Salsiccia suino	5526	347/4	PE	presente	positivo	AC	<i>S. salford</i>	Bioball
40	Salsiccia suino	5526	347/5	PE	presente	positivo	AC	<i>S. typhimurium</i>	Bioball
41	Salsiccia suino	5527	348/1	PE	presente	positivo	AC	<i>S. typhimurium</i>	Bioball
42	Salsiccia suino	5527	348/2	PE	presente	positivo	AC	<i>S. typhimurium</i>	Bioball
43	Salsiccia suino	5527	348/3	PE	presente	positivo	AC	<i>S. typhimurium</i>	Bioball
44	Salsiccia suino	5527	348/4	PE	presente	positivo	AC	<i>S. typhimurium</i>	Bioball
45	Salsiccia suino	5527	348/5	PE	presente	positivo	AC	<i>S. typhimurium</i>	Bioball

	Matrice	NRG	NRR	sede	Metodo di riferimento	Metodo da validare
46	muscolo pollo	34	1	TE	assente	negativo
54	muscolo tacchino	338	30	TE	assente	negativo
55	muscolo tacchino	338	30	TE	assente	negativo
56	muscolo tacchino	338	30	TE	assente	negativo
57	muscolo tacchino	338	30	TE	assente	negativo
58	Salsiccia suino	700	36	TE	assente	negativo
59	Salsiccia suino	700	36	TE	assente	negativo
60	Salsiccia suino	700	36	TE	assente	negativo
61	Salsiccia suino	700	36	TE	assente	negativo
62	Salsiccia suino	700	36	TE	assente	negativo
63	Salsiccia suino	700	36	TE	assente	negativo
64	muscolo pollo	1282	79/1	TE	assente	negativo
65	muscolo pollo	1282	79/2	TE	assente	negativo
66	muscolo pollo	1282	79/3	TE	assente	negativo
67	muscolo pollo	1282	79/4	TE	assente	negativo
68	muscolo pollo	1282	79/5	TE	assente	negativo
69	muscolo pollo	1739	125	TE	assente	negativo
70	muscolo pollo	1739	125/2	TE	assente	negativo
71	muscolo pollo	1739	125/3	TE	assente	negativo
72	muscolo pollo	1739	125/4	TE	assente	negativo
73	muscolo pollo	1739	125/5	TE	assente	negativo
74	carne var. conf.	916	73/1	PE	assente	negativo
75	carne var. conf.	916	73/2	PE	assente	negativo
76	carne var. conf.	916	73/3	PE	assente	negativo
77	carne var. conf.	916	73/4	PE	assente	negativo
78	carne var. conf.	916	73/5	PE	assente	negativo
79	carne macinata	917	72/1	PE	assente	negativo
80	carne macinata	917	72/2	PE	assente	negativo
81	carne macinata	917	72/3	PE	assente	negativo
82	carne macinata	917	72/4	PE	assente	negativo
83	carne macinata	917	72/5	PE	assente	negativo
84	salsiccia	1055	91	PE	assente	negativo

\*NC= naturalmente contaminato AC= artificialmente contaminato

**Tabella dei risultati**  
**Sensibilità relativa, Specificità relativa, Accuratezza relativa**  
**PRODOTTI LATTIERO-CASEARI**

	Matrice	NRG	NRR	Sede di esecuzione	Metodo di riferimento	Metodo da validare	NC/AC*	Ceppo batterico	Materiale utilizzato
1	ricotta	2814	229	TE	presente	positivo	NC		
2	ricotta	2814	229	TE	presente	positivo	NC		
3	ricotta	2814	229	TE	presente	positivo	NC		
4	ricotta	2814	229	TE	presente	positivo	NC		
5	ricotta	2814	229	TE	presente	positivo	NC		
6	Scamorza di bovino	3601	313	TE	presente	positivo	NC		
7	Scamorza di bovino	3601	313	TE	presente	positivo	NC		
8	Scamorza di bovino	3601	313	TE	presente	positivo	NC		
9	Scamorza di bovino	3601	313	TE	presente	positivo	NC		
10	Scamorza di bovino	3601	313	TE	presente	positivo	NC		
11	Scamorza di bovino	4808	406	TE	presente	positivo	NC		
12	Scamorza di bovino	4808	406	TE	presente	positivo	NC		
13	Scamorza di bovino	4808	406	TE	presente	positivo	NC		
14	Scamorza di bovino	4808	406	TE	presente	positivo	NC		
15	Scamorza di bovino	4808	406	TE	presente	positivo	NC		
16	Scamorza di bovino	6273	557	TE	presente	positivo	NC		
17	Scamorza di bovino	6273	557	TE	presente	positivo	NC		
18	Scamorza di bovino	6273	557	TE	presente	positivo	NC		
19	Scamorza di bovino	6273	557	TE	presente	positivo	NC		
20	Scamorza di bovino	6273	557	TE	presente	positivo	NC		
21	caciotta	9681	806	TE	presente	positivo	NC		
22	caciotta	9681	806	TE	presente	positivo	NC		
23	caciotta	9681	806	TE	presente	positivo	NC		
24	caciotta	9681	806	TE	presente	positivo	NC		
25	caciotta	9681	806	TE	presente	positivo	NC		
26	caciotta	8614	802	TE	presente	positivo	NC		
27	caciotta	8614	802	TE	presente	positivo	NC		
	<b>Matrice</b>	<b>NRG</b>	<b>NRR</b>	<b>Sede di esecuzione</b>	<b>Metodo di riferimento</b>	<b>Metodo da validare</b>	<b>NC/AC*</b>	<b>Ceppo batterico</b>	<b>Materiale utilizzato</b>
28	caciotta	8614	802	TE	presente	positivo	NC		

29	caciotta	8614	802	TE	presente	positivo	NC	
30	caciotta	8614	802	TE	presente	positivo	NC	
31	Scamorza di Bovino	4638	293/1	PE	presente	negativo	AC	S. typhimurium Bioball
32	Scamorza di Bovino	4638	293/2	PE	presente	negativo	AC	S. typhimurium Bioball
33	Scamorza di Bovino	4638	293/3	PE	presente	negativo	AC	S. typhimurium Bioball
34	Scamorza di Bovino	4638	293/4	PE	presente	negativo	AC	S. typhimurium Bioball
35	Scamorza di Bovino	4638	293/5	PE	presente	negativo	AC	S. typhimurium Bioball

	Matrice	NRG	NRR	Sede di esecuzione	Metodo di riferimento	Metodo da validare
36	formaggi	1739	125/2	TE	assente	negativo
37	formaggi	1739	125/3	TE	assente	negativo
38	formaggi	1739	125/4	TE	assente	negativo
39	formaggi	1739	125/5	TE	assente	negativo
40	formaggi	2018	150/1	TE	assente	negativo
41	formaggi	2018	150/2	TE	assente	negativo
42	formaggi	2018	150/3	TE	assente	negativo
43	formaggi	2018	150/4	TE	assente	negativo
44	formaggi	2018	150/5	TE	assente	negativo
45	formaggi	2018	150/6	TE	assente	negativo
46	formaggi	2018	150/7	TE	assente	negativo
47	formaggi	8614	741	TE	assente	negativo
48	formaggi	8614	741	TE	assente	negativo
49	formaggi	8614	741	TE	assente	negativo
50	formaggi	8614	741	TE	assente	negativo
51	formaggi	8614	741	TE	assente	negativo
52	formaggi	9681	806	TE	assente	negativo
53	formaggi	9681	806	TE	assente	negativo
54	formaggi	9681	806	TE	assente	negativo
55	formaggi	9681	806	TE	assente	negativo
56	formaggi	9681	806	TE	assente	negativo
57	formaggi	9751	831	TE	assente	negativo
58	formaggi	9751	831	TE	assente	negativo
59	formaggi	9751	831	TE	assente	negativo
60	formaggi	9751	831	TE	assente	negativo

\*NC= naturalmente contaminato AC= artificialmente contaminato

## Livelli di contaminazione/Selettività: ceppi batterici utilizzati

Ceppo batterico	Id. di riferimento
<i>S. havana</i>	Ceppo di campo
<i>S. infantis</i>	Ceppo di campo
<i>S. mbandaka</i>	Ceppo di campo
<i>S. enteridits</i>	Ceppo di campo
<i>S. blokley</i>	Ceppo di campo
<i>S. virchow</i>	Ceppo di campo
<i>S. hadar</i>	Ceppo di campo
<i>S. colorado</i>	Ceppo di campo
<i>S. isangi</i>	Ceppo di campo
<i>S. derby</i>	Ceppo di campo
<i>S. branderup</i>	Ceppo di campo
<i>S. typhimurium</i>	Bioball
<i>S. abaetuba</i>	Bioball
<i>S. salford</i>	Bioball

## Selettività: Risultati delle prove con ceppi batterici target

Id. di riferimento	Ceppo batterico	Risultati	
		Metodo di riferimento	Metodo da validare
16375/1542	<i>S. typhimurium</i>	presente	positivo
16375/1542	<i>S. enteritidis</i>	presente	positivo
16891/1595	<i>S. derby</i>	presente	positivo
16891/1595	<i>S. typhimurium</i>	presente	positivo
16891/1595	<i>S. infantis</i>	presente	positivo
16891/1595	<i>S. enteritidis</i>	presente	positivo
16891/1595	<i>S. thompson</i>	presente	positivo
16891/1595	<i>S. rissen</i>	presente	positivo
18179/1740	<i>S. typhimurium</i>	presente	positivo
18179/1740	<i>S. havana</i>	presente	positivo
18179/1740	<i>S. meleagridis</i>	presente	positivo
18179/1740	<i>S. branderup</i>	presente	positivo
18179/1740	<i>S. blocklei</i>	presente	positivo
18776/1816	<i>S. daytona</i>	presente	positivo
18776/1816	<i>S. hadar</i>	presente	positivo
18776/1816	<i>S. typhimurium</i>	presente	positivo
18776/1816	<i>S. livingstone</i>	presente	positivo
18776/1816	<i>S. branderup</i>	presente	positivo
18776/1816	<i>S. enteritidis</i>	presente	positivo
20049/1913	<i>S. derby</i>	presente	positivo
20049/1913	<i>S. isangi</i>	presente	positivo
20049/1913	<i>S. virchow</i>	presente	positivo
20049/1913	<i>S. colorado</i>	presente	positivo
20049/1913	<i>S. instanbull</i>	presente	positivo
20049/1913	<i>S. mbandaka</i>	presente	positivo
20049/1913	<i>S. typhimurium</i>	presente	positivo

## 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 6579. 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs -Horizontal method for the detection of Salmonella spp.,-15/7/2002, 33 pp.
- International Standard Organisation/ISO 6579. 2002. Technical Corrigendum, 1/4/2004, 1 p.