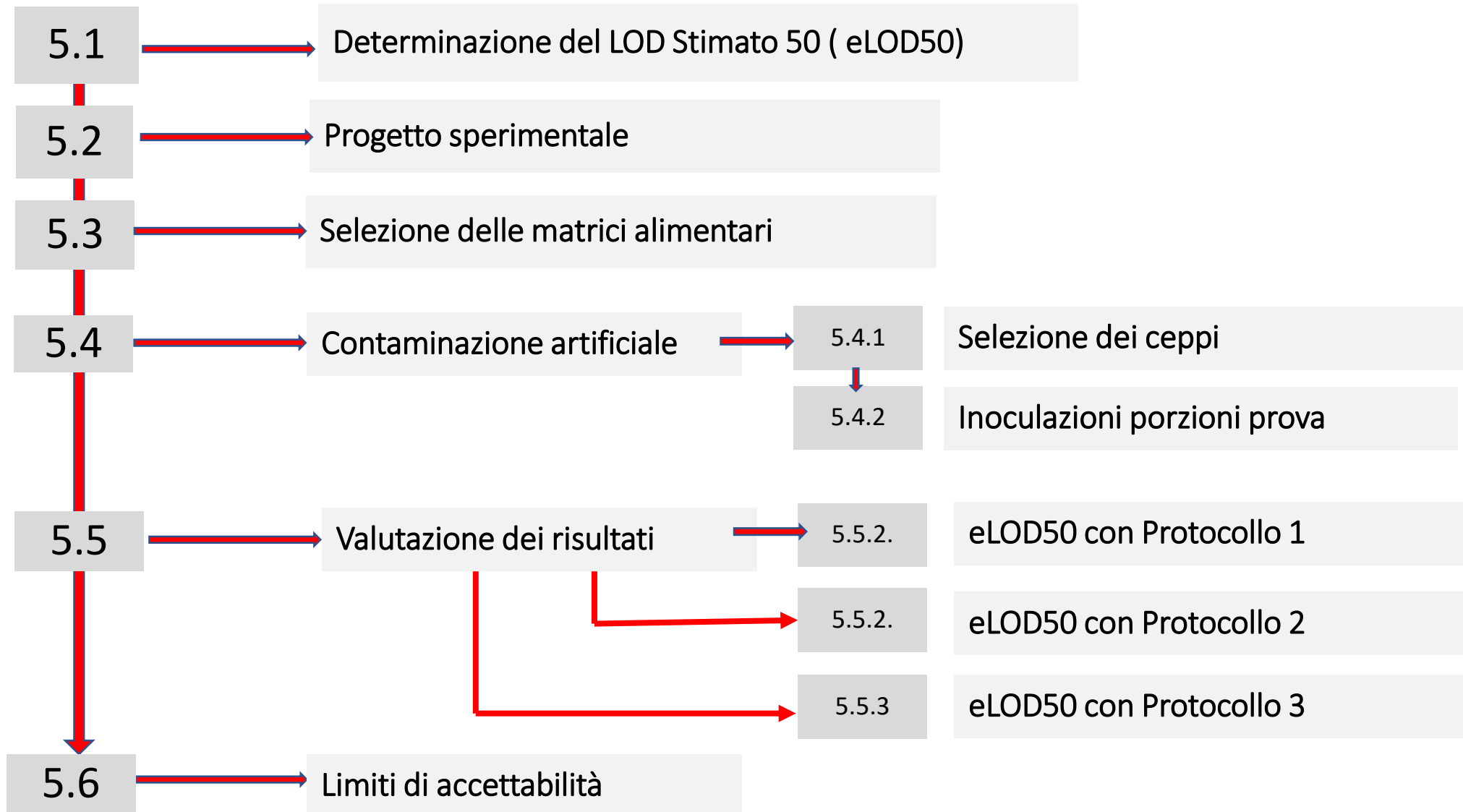


1 Quali parametri dobbiamo verificare

Metodo QUALITATIVO	Verifica implementazione	LOD stimato ₅₀ (eLOD ₅₀)
	Verifica delle matrici (alimentari)	LOD stimato ₅₀ (eLOD ₅₀)
Metodo QUANTITATIVO	Verifica implementazione	Scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio (S _{IR})
	Verifica delle matrici (alimentari)	Errore sistematico stimato (eBIAS)
Esecuzione completa del metodo per ogni campione		
N° colonie per la conferma	Riducibile a 1	

5

PROTOCOLLO TECNICO DELLE VERIFICA



5.1

Determinazione del LOD stimato 50

eLOD₅₀

eLOD₅₀

Verifica di implementazione



dimostra la competenza nell'eseguire il metodo



eLOD₅₀

Verifica delle matrici (alimentari)



dimostra la competenza nell'eseguire il metodo su
certe matrici



Esecuzione completa del metodo per ogni campione

N° colonie per la conferma

Riducibile a 1

5.2 Progetto sperimentale

selezione dei protocolli

Coltura di laboratorio

livello di contaminazione **INCERTO**

PROT.1

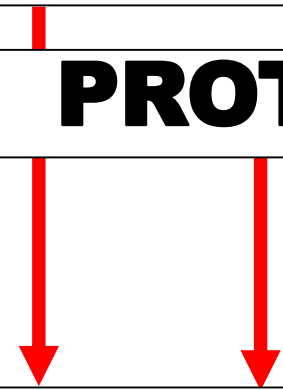
MRCT

livello di contaminazione **NOTO**

PROT.2

Quando 1 e 3 non hanno funzionato

PROT.3



5.2 Progetto sperimentale

selezione dei protocolli

Protocolli per determinare il LOD₅₀ e numero massimo di **repliche (*)** per livello di inoculazione

Livello di inoculazione della porzione di prova

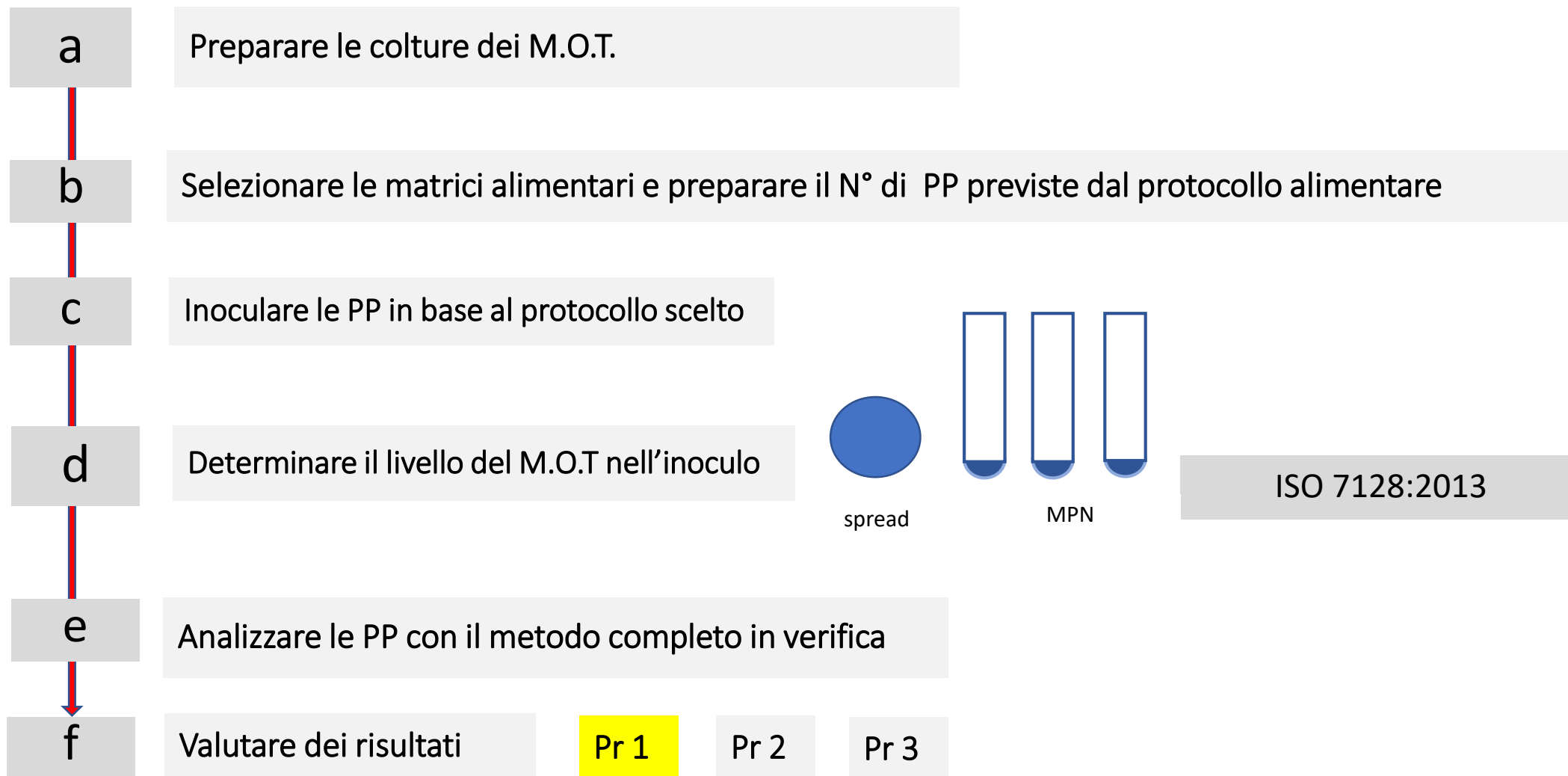
Prospetto 3	ALTO	MEDIO	BASSO	3-5 ufc /PP	BIANCO	N° TOTOALE REPLICHE
	9 x LOD ₅₀ /PP	3 x LOD ₅₀ /PP	1 x LOD ₅₀ /PP			
prot.1	1	4	4	-	1	10
prot. 2	-	3	5	-	1	9
prot.3	-	-	-	7	1	8

(*) 16140-1:2016 2.69: **replica** : ripetizione della prova di diverse parti dello stesso campione per ottenere una misura indipendente

5.2

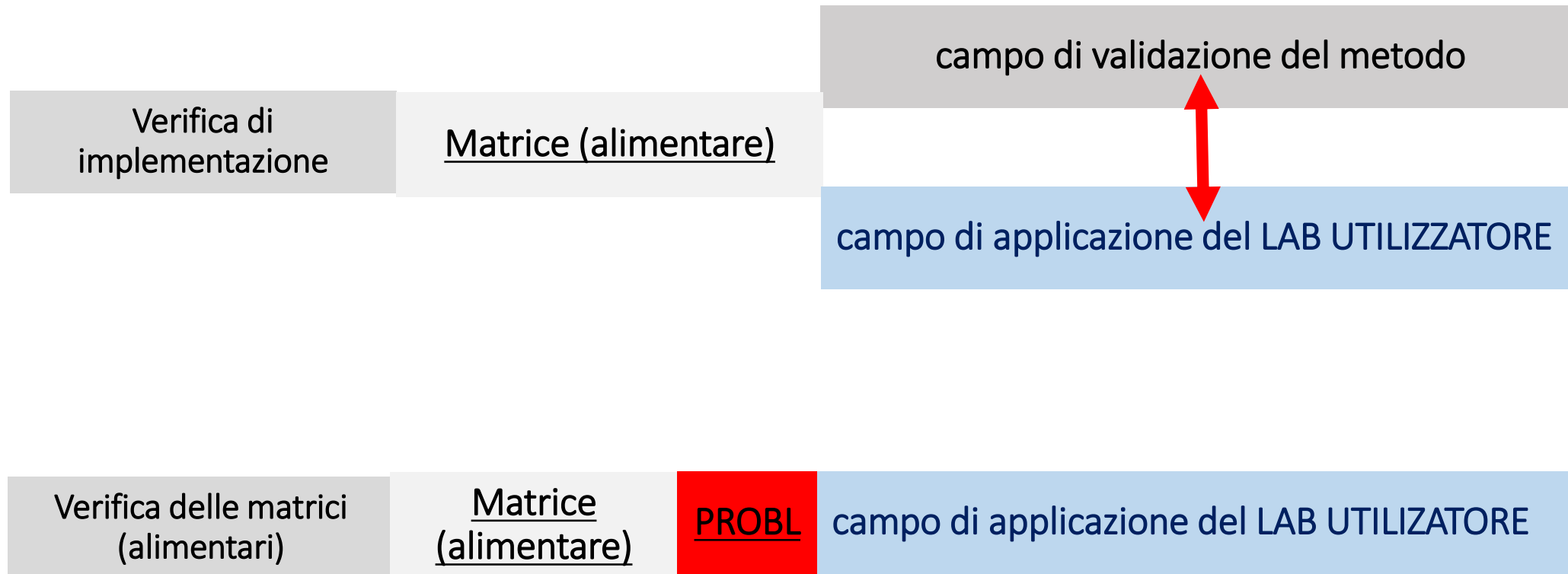
Progetto sperimentale

Schema di esecuzione dei protocolli



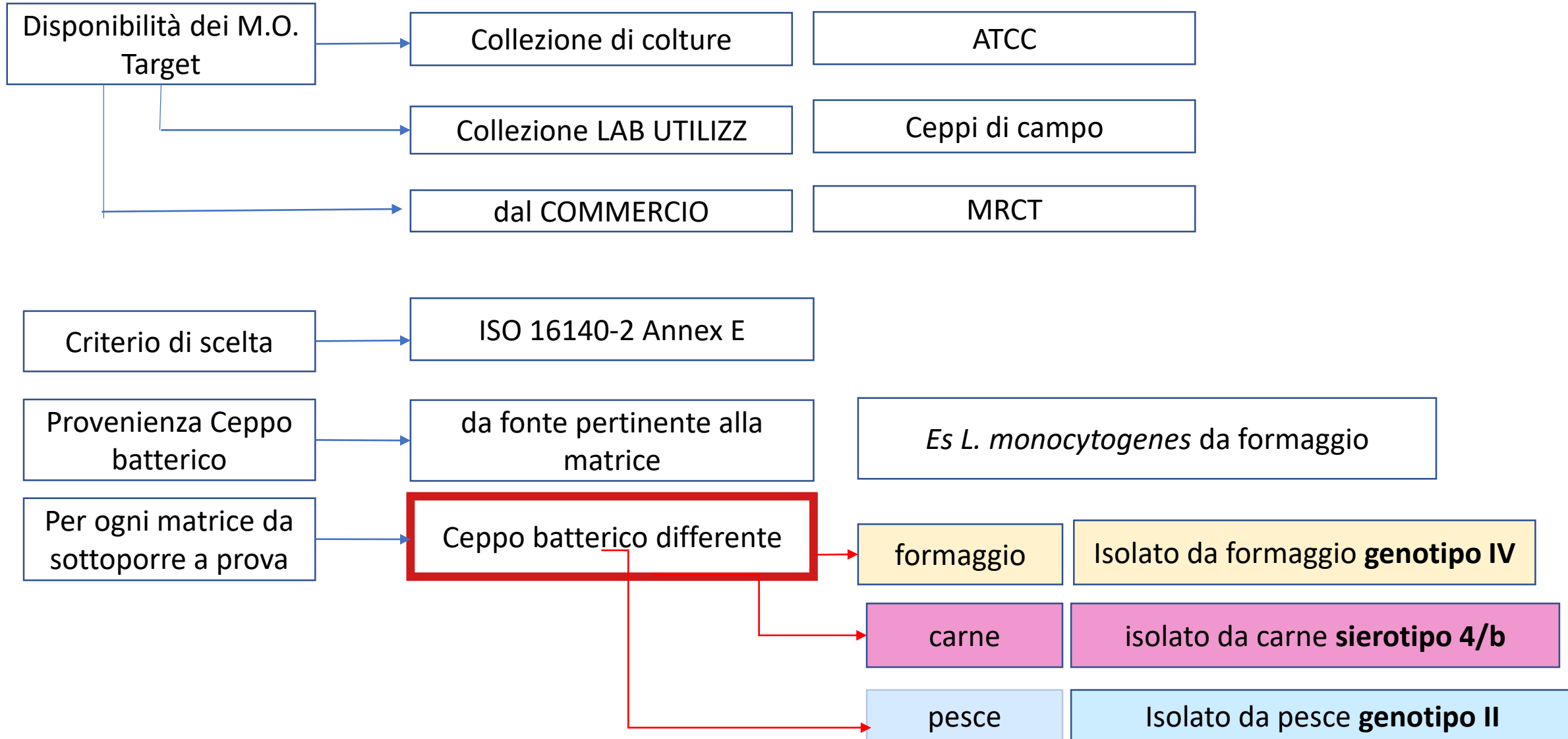
5.3

Selezione delle matrici (alimentari)



5.4 Contaminazione artificiale

5.4.1 Selezione dei ceppi



5.4 Contaminazione artificiale

5.4.1 Selezione del ceppo

Categoria alimento	tipo	matrice	Ceppo : <i>L. Monocytogenes</i>
latte e pr latt caseari TERMIZZATI	pr latt caseari PASTORIZZATI	Primo sale	12MOB112LM isolato lattiero caseario <i>genotipo iv</i>
Carne e prod. carnei RTC (NO POLLAME)	Pronti per la cottura	Hamburger	WDCM 00109 isolato di carne <i>genotipo II</i>
Pesci e frutti di mare crudi RTC non trasformati	Pesce frutti di mare pronti per la cottura	Bastoncini di pesce surgelati	Ceppo di campo isolato da pesce <i>genotipo II</i>

[WDCM World Data Center for Microorganisms](#)

5.4 Contaminazione artificiale

5. 4.1 Selezione del ceppo

Data sheet related to the EURL Lm set of *Listeria monocytogenes* strains

Strains set: EURL

Genoserotype: II

Name: *Listeria monocytogenes*

Date of isolation: 28/11/2011

Type of microorganism: bacteria

Culture medium: agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti

Strains set reference: 12MOB118LM

Origin: dairy products

Temperature: 37°C

Geographical origin: France

Atmosphere of incubation: air

Growth parameters At 8°C pH 7 aw 0.98

At 20°C pH 5 aw 0.98

At 20°C pH 7 aw 0.95

Maximum growth rate (h⁻¹) 0.093±0.007 0.173±0.025 0.132±0.123

Bibliography: /

5.4 Contaminazione artificiale

5. 4.1 Selezione del ceppo


Catalogo dei ceppi di riferimento WDCM:

questo catalogo è stato prodotto per consentire un accesso più ampio e più facile ai ceppi di riferimento elencati dal gruppo di lavoro congiunto ISO TC 34 SC 9 5 e dal gruppo di lavoro sui mezzi di coltura del Comitato internazionale per la microbiologia e l'igiene alimentare (ICFMH -WPCM) nella loro pubblicazione Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology. Soddisfa un'esigenza espressa da questi organismi per un sistema unico di identificatori per i ceppi raccomandati per l'uso nell'assicurazione della qualità.

5.4 Contaminazione artificiale

5.4.1 Selezione del ceppo

Catalogo dei ceppi di riferimento WDCM:



WORLD DATA CENTRE
FOR MICROORGANISMS

WDCM Reference Strain Catalogue

[Home](#)[Browse](#)[Search](#)[Standards](#)[History](#)[Credit](#)[WDCM SOP](#)

[By Species](#)[By WDCM Number](#)[By Culture Collection](#)[By Standard Method](#)

A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z

☒ Bacteria ☐ Filamentous Fungi and Yeasts

There are **107** bacterial species recorded made up of **166** reference strains

<i>Acinetobacter</i> sp. WDCM 00060	CECT 8149; NCIMB 10764; NCIMB(QC) 50011;
<i>Aerococcus viridans</i> WDCM 00061	ATCC™ 11563; BCRC 14290; CCM 1914; CCUG 4311; CECT 978; CIP 54.145; DSM 20340; HNCMB 86001; LMG 17931; NBRC 12219; NCIMB 11775; NCIMB(QC) 50012; NCTC 8251;
<i>Aeromonas caviae</i> WDCM 00062	ATCC™ 15468; BCRC 16001; CCM 4491; CCUG 25939; CECT 838; CGMCC 1.1960; CIP 76.16; DSM 7323; LMG 3775; NCIMB 13016; NCTC 12244;
<i>Aeromonas hydrophila</i>	

5.4 contaminazione artificiale

5.4.2 inoculazione delle PP

Determinare il livello di contaminazione



Sceita del protocollo

Prospetto 3

Determinare livello inoculo

Prospetto 4

controllare LOD₅₀ espresso o non espresso

Produrre l'inoculo batterico



coltura del ceppo in condizione ottimali

Conteggio preliminare



Conteggio inoculo effettivo (eventuale)

(COLTURE SOLLECITATE).



ISO 16140-2:2016

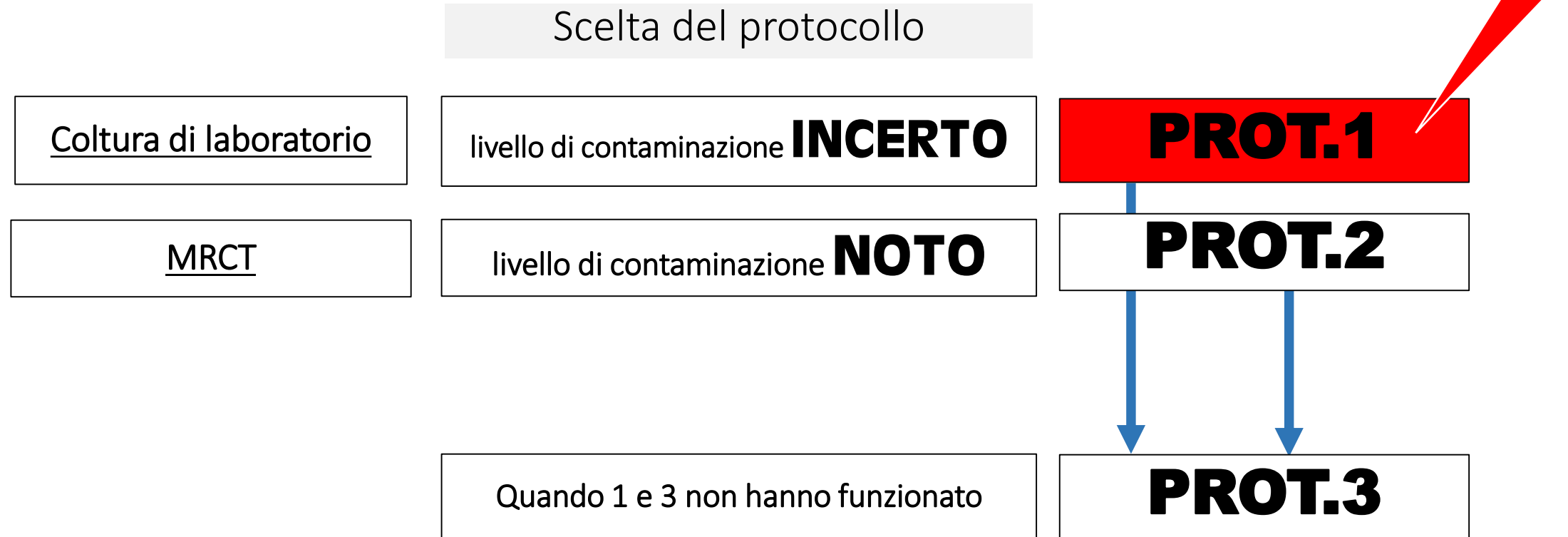
Contaminare le PP



Miscelare le S.I.

5.4 contaminazione artificiale

5.4.2 inoculazione delle PP



5.4 contaminazione artificiale

5.4.2 inoculazione delle PP

Determinazione del livello di inoculo per ciascun protocollo

Prospetto 4	Livello di inoculazione per ciascun protocollo			
	ALTO 9 x LOD₅₀ /porzione di prova	MEDIO 3 x LOD₅₀ /porzione di prova	BASSO 1 x LOD₅₀ /porzione di prova	3-5 ufc /pp
protocollo1	≤ 9 x LOD ₅₀ previsto	Diluizione 1:3 da ALTO	diluizione 1:3 da MEDIO	*****
protocollo2	*****	≤3 x LOD ₅₀ previsto	diluizione 1:3 da MEDIO per ottenere il BASSO	*****
protocollo3	*****	*****	*****	Livello contaminazione noto (MRCT)

5.4 contaminazione artificiale

5.4.2 inoculazione delle PP

Numero necessario di repliche (*)

Prospetto 3	Livello di inoculazione della porzione di prova					
	ALTO	MEDIO	BASSO	3-5 ufc /pp	BIANCO	N° TOTOALE REPLICHE
	9 x LOD ₅₀ /pp	3 x LOD ₅₀ /pp	1 x LOD ₅₀ /pp			
prot.1	1	4	4	-	1	10
prot. 2	-	3	5	-	1	9
prot.3	-	-	-	7	1	8

(*) 16140-1:2016 2.69: **replica** : ripetizione della prova di diverse parti dello stesso campione per ottenere una misura indipendente

5.4 contaminazione artificiale

5.4.2 inoculazione delle PP

Controllo del LOD₅₀ del metodo

LOD ₅₀ del metodo UNI EN ISO 6579 Salmonella spp.						
	Categoria-matrice	LOD ₅₀ del metodo		Livello di contaminazione ufc/pp con protocollo 1		
				Basso	Medio	Alto
RVS broth + MKKTTn broth	Cagliata fresca	5,7	(4,0 - 8,1)	5.7	17.1	51.3
	Uova in polvere	6,0	(4,7 - 7,7)	6	18	54
	Carne cruda di pollo	2,2	(1,5 - 3,2)	2.2	6.6	19.8
	MR	Non espresso		<1	<1	<1
MRSV agar	Feci di pollo	2,5	(2,1 - 3,0)	2.5	7.5	22.5
	Feci di maiale	3,2	(2,8 - 3,8)	3.2	9.6	28.8
	Calzari	3,8	(3,2 - 4,4)	3.8	11.4	34.2

5.4 contaminazione artificiale

5.4.2 inoculazione delle PP

Controllo del LOD₅₀ del metodo

LOD ₅₀ del metodo					
metodo	Categoria-matrice	LOD ₅₀ del metodo	Livello di contaminazione ufc/pp		
			Basso	Medio	Alto
<i>Campylobacter</i> proc. C	Materiale cecale broilers	6,1 (3,1-12)	6,1	18,3	54,9
<i>Campylobacter</i> proc. B	Latte crudo	57 (46-70)	57	171	513
<i>Shigella</i>	Non espresso	Non espresso	<= 1		

5.4 contaminazione artificiale

5.4.2 inoculazione delle PP

	esempio		
metodo	ISO 6579- Salmonella		
Categoria-tipo -matrice	Pollame crudo e pr a base di pollame pronti per la cottura	Carni fresche non trasfonrmate	Carne cruda di pollo
protocollo	1		
LOD ₅₀	2,2 ufc/PP		
Livello inoculo da conteggiare	Livello inoculo ALTO		
	Livello inoculo ALTO	9 x 2,2 ufc/ PP=	19,8 ufc/PP
	Livello inoculo MEDIO	3 x 2,2 ufc/ PP =	6,6 ufc/PP
	Livello inoculo BASSO	1 x 2,2 ufc/ PP=	2,2 ufc/PP

5.4 contaminazione artificiale

5.4.2 inoculazione delle PP

Diluizioni e numero corrispondente di repliche per i protocolli 1,2, e 3 con più diluizioni rispetto al minimo richiesto

Prospetto 5	Livello di inoculazione per ciascun protocollo					
	Diluizione A (10 ⁻ⁿ)	Diluizione B 1:3 di A	Diluizione C 1:3 di B	Diluizione D 1:3 di C	Diluizione E 1:3 di D	Diluizione F 1:3 di E
protocollo1	1	4	4	4	4	4
protocollo2	-	3	5	5	5	5
protocollo3	-	-	7	7	7	7

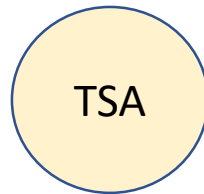
5.4 contaminazione artificiale

5.4.2 inoculazione delle PP

Preparazione dei MO per le prove di performance

ISO 11333:2018 par.5

Preparazione della
coltura stock

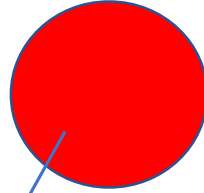
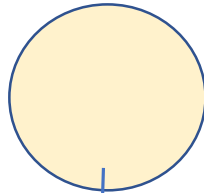


M.O. Aerobio termofilo

37 °C x 18-24 h

ISO 11333:2018 5.4.2.1

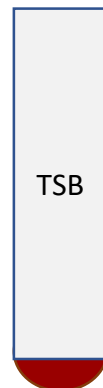
Lettura per purezza
delle colonie



Colonie isolate

1- 2 colonie con ansa di
1 µl

Brodo non selettivo



37 °C x 18-24 h

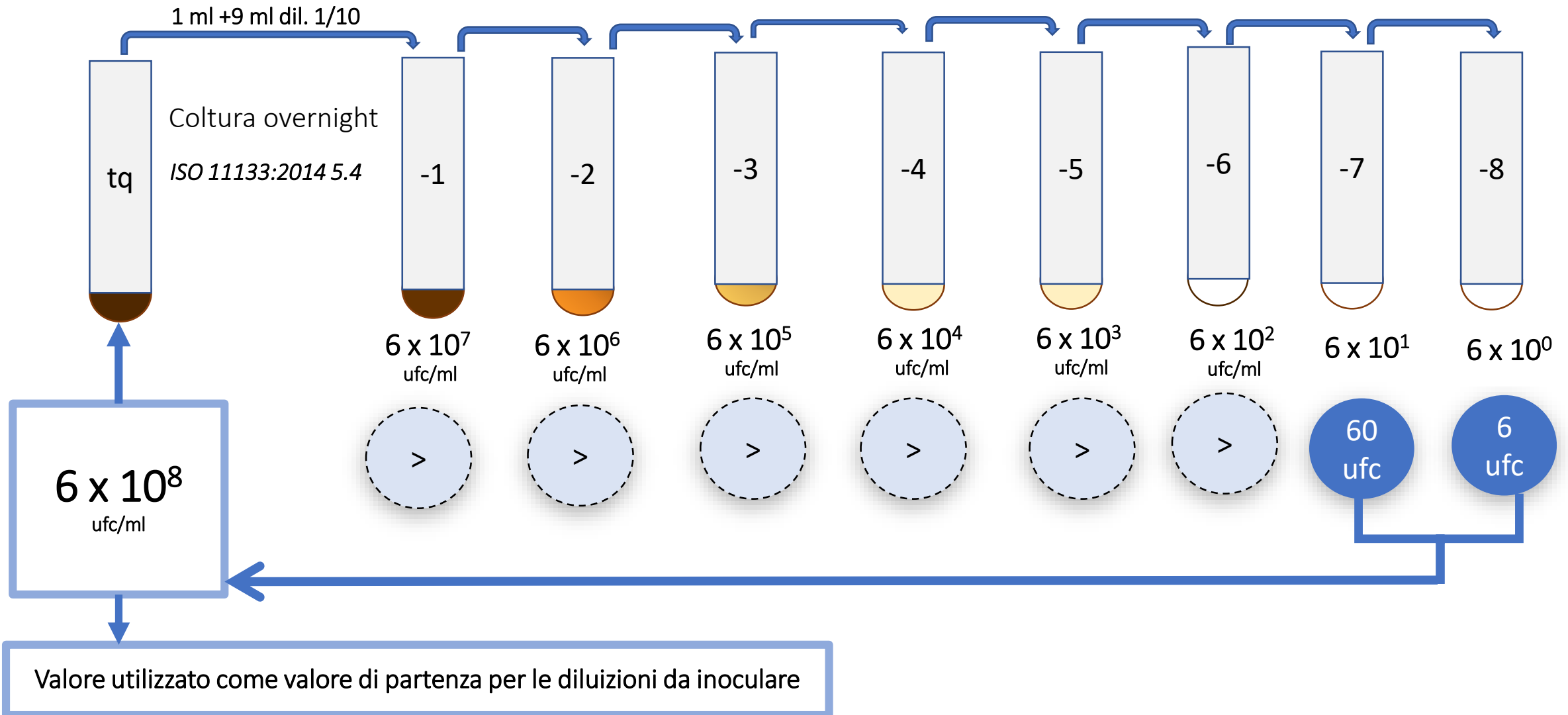
Coltura in fase di crescita stazionaria

ISO 11333:2018 5.4.2.2

C.2 PREPARAZIONE PER LA VERIFICA

da 16140-3:2016 figura C1

Conteggio **PRELIMINARE** del livello di inoculo



C.2 PREPARAZIONE PER LA VERIFICA

da 16140-3:2016 figura C1

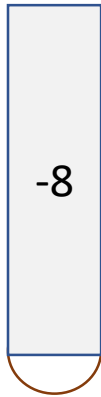
Conteggio **PRELIMINARE** del livello di inoculo

Diluizione A



6×10^1

60
ufc



6×10^0

6
ufc

Livello inoculo ALTO

9 x 2,2 ufc/ PP=

19,8 ufc/PP

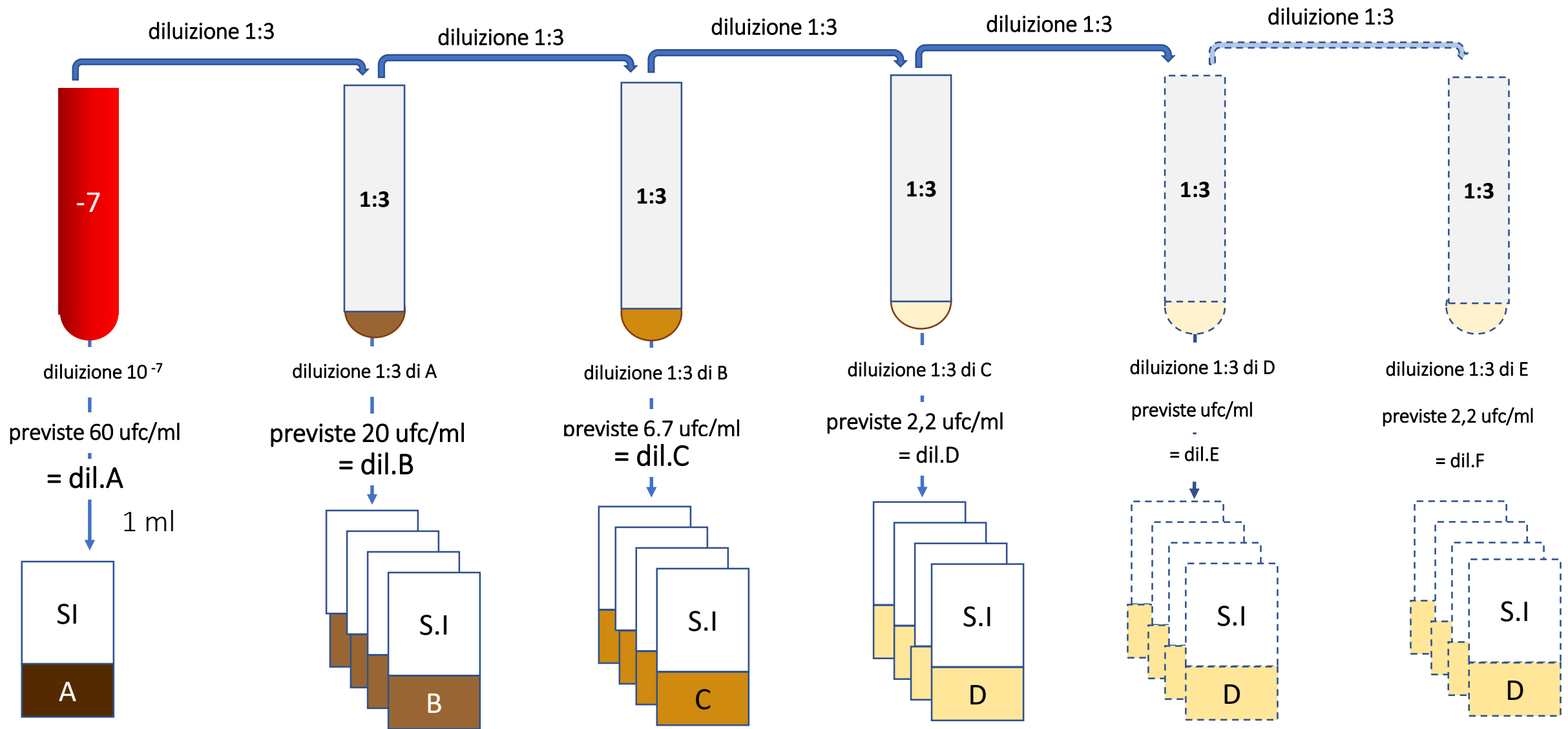
5.4 contaminazione artificiale

5.4.2 inoculazione delle PP

Diluizioni e numero corrispondente di repliche per i protocolli 1,2, e 3 con più diluizioni rispetto al minimo richiesto

Prospetto 5	Livello di inoculazione per ciascun protocollo					
	Diluizione A (10 ⁻⁷)	Diluizione B 1:3 di A	Diluizione C 1:3 di B	Diluizione D 1:3 di C	Diluizione E 1:3 di D	Diluizione F 1:3 di E
protocollo1	1	4	4	4	4	4
protocollo2	-	3	5	5	5	5
protocollo3	-	-	7	7	7	7
	60 ufc/ml	20 ufc/ml	6,7 ufc/ml	2,2 ufc/ml		

C.3 inoculazione delle PP

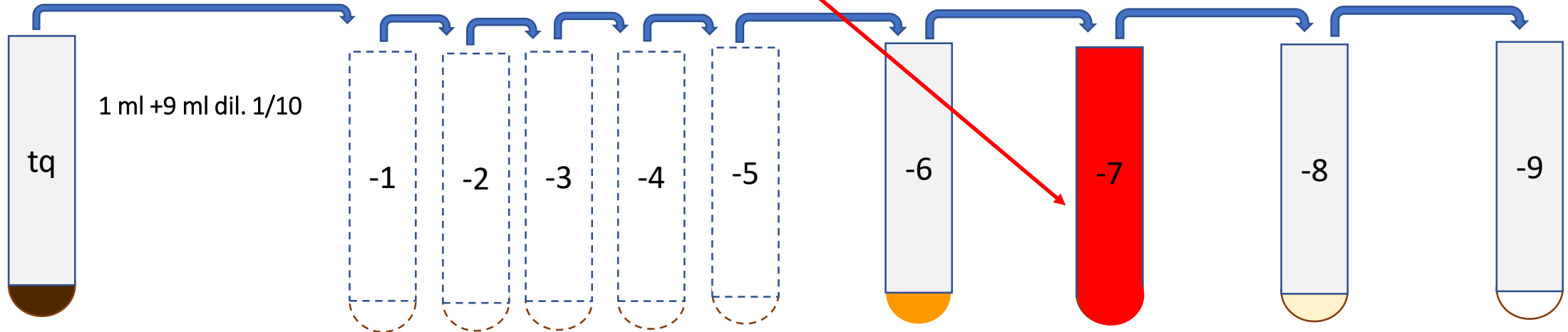


C.3 VERIFICA del conteggio effettivo dell'inoculo

da 16140-3:2016 figura C2

Livello inoculo ALTO stABILITO

19,8 ufc/PP



Coltura overnight

ISO 11133:2014 5.4

Fase stazionaria di crescita

Previsto 10^8 ufc/ml

previste
600
ufc/ml

550
ufc

previste
60
ufc/ml

54
ufc

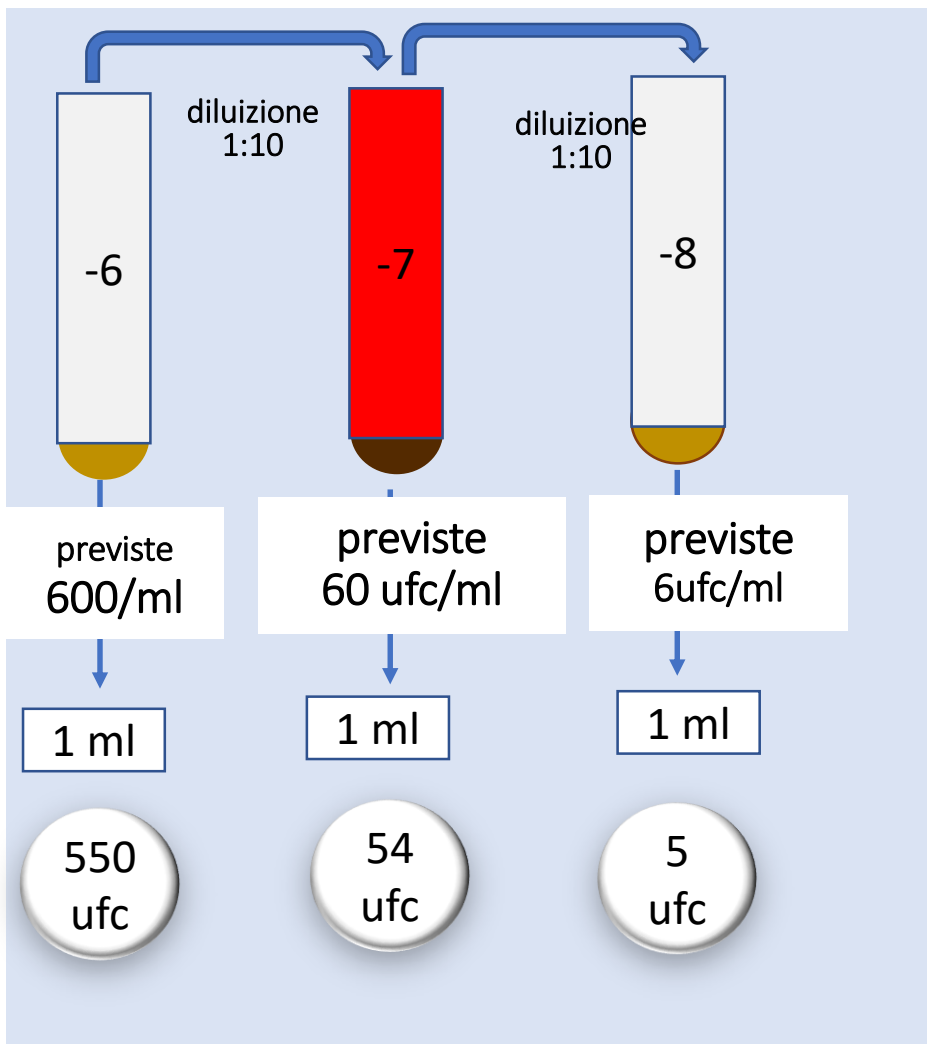
previste
 6×10^0 ufc/ml

5
ufc

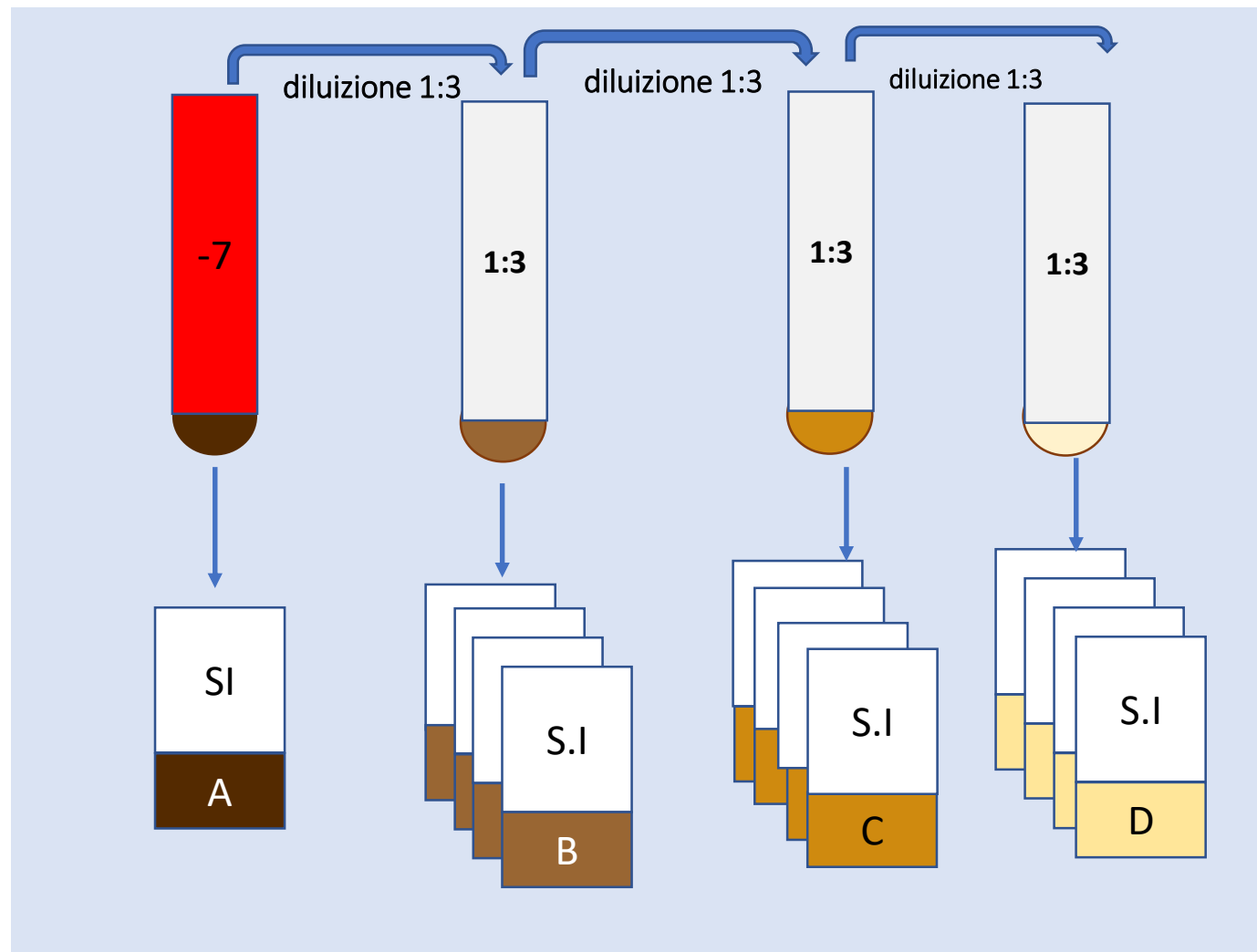
Conteggio contemporaneo alla contaminazione delle PP

C.3 VERIFICA del conteggio effettivo dell'inoculo e inoculazioni PP prot 1

Conta del livello effettivo dell'inoculo



Inoculazioni PP con protocollo 1



5.5 Valutazione dei risultati

Determinazione dei livelli di **inoculo pertinenti**

pp	dil A	dil B	dil C	dil D	dil E	dil F
N° PP inoculate	1	4	4	4	4	4
V inoculo	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1ml
diluizioni	A 10 -7	B 1:3 di A	C 1:3 di B	D 1:3 di C	E 1:3 di D	F 1:3 di E
[M.O.T] ATTESA	60	20	6,7	2,2	0,7	0,2
[M.O T] OTTENUTA	54	18	6	2	0,6	<0,3
conteggio (ISO 7218) per	spread	Su piastra	MPN	MPN	MPN	MPN
POSITIVI	1	4	4	3	0	0
		HIL	MIL	LIL		
PP da valutare		1	4	3		

LOD50 ufc/pp

2,2

5.5.1 Determinazione dell' eLOD₅₀ in base al numero di risultati positivi per livelli di contaminazione con **prot. 1**

PROSPETTO 6	HIL	MIL	LIL	BIANCO	LOD ₅₀
	18	6	2	0	2,2
	1	4	3	0	

HIL	MIL	LIL	BIANCO	eLOD ₅₀ ufc/pp	
1/1	4/4	4/4	0/1	<1,0 x LIL	<1,0 x 2,2
1/1	4/4	3/4	0/1	=0,5 x LIL	1,0
1/1	4/4	2/4	0/1	=0,7 x LIL	1,54
1/1	4/4	1/4	0/1	=1,0 x LIL	2,2
1/1	4/4	0/4	0/1	=1,5 x LIL	3,3
1/1	3/4	4/4	0/1	=0,7 x LIL	1,54
1/1	3/4	3/4	0/1	=1,0 x LIL	2,2
1/1	3/4	2/4	0/1	=1,3 x LIL	2,86
1/1	3/4	1/4	0/1	=1,7 x LIL	3,74
1/1	3/4	0/4	0/1	=2,3 x LIL	5,06
1/1	2/4	4/4	0/1	=1,1 x LIL	2,42
1/1	2/4	3/4	0/1	=1,5 x LIL	3,3
1/1	2/4	2/4	0/1	=1,9 x LIL	4,18
1/1	2/4	1/4	0/1	=2,6 x LIL	5,72
1/1	2/4	0/4	0/1	=3,7 x LIL	8,14
1/1	1/4	4/4	0/1	Risultato MPN non affidabile	//////////
1/1	1/4	3/4	0/1	=2,8 x LIL	6,16
1/1	1/4	2/4	0/1	=4,0 x LIL	8,8

Determinazione dell'eLOD₅₀ in base al numero di risultati positivi per livello di contaminazione utilizzando il protocollo 1

Livello di inoculazione alto obiettivo 9 × LOD ₅₀ /porzione di prova	Livello di inoculazione intermedio obiettivo 3 × LOD ₅₀ /porzione di prova	Livello di inoculazione basso obiettivo 1 × LOD ₅₀ /porzione di prova	Livello in bianco	eLOD ₅₀ cfu/porzione di prova
1/1	4/4	4/4	0/1	< 1,0 × LIL ^{a)}
1/1	4/4	3/4	0/1	= 0,5 × LIL
1/1	4/4	2/4	0/1	= 0,7 × LIL
1/1	4/4	1/4	0/1	= 1,0 × LIL
1/1	4/4	0/4	0/1	= 1,5 × LIL
1/1	3/4	4/4	0/1	= 0,7 × LIL
1/1	3/4	3/4	0/1	= 1,0 × LIL
1/1	3/4	2/4	0/1	= 1,3 × LIL
1/1	3/4	1/4	0/1	= 1,7 × LIL
1/1	3/4	0/4	0/1	= 2,3 × LIL
1/1	2/4	4/4	0/1	= 1,1 × LIL
1/1	2/4	3/4	0/1	= 1,5 × LIL
1/1	2/4	2/4	0/1	= 1,9 × LIL
1/1	2/4	1/4	0/1	= 2,6 × LIL
1/1	2/4	0/4	0/1	= 3,7 × LIL
1/1	1/4	4/4	0/1	Risultato MPN non affidabile ^{b)}
1/1	1/4	3/4	0/1	= 2,1 × LIL
1/1	1/4	2/4	0/1	= 2,8 × LIL
1/1	1/4	1/4	0/1	= 4,0 × LIL
1/1	1/4	0/4	0/1	= 6,3 × LIL
1/1	0/4	4/4	0/1	Risultato MPN non affidabile ^{b)}
1/1	0/4	3/4	0/1	= 3,0 × LIL
1/1	0/4	2/4	0/1	= 4,3 × LIL
1/1	0/4	1/4	0/1	= 6,7 × LIL
1/1	0/4	0/4	0/1	= 14,0 × LIL

a) LIL = Livello di inoculazione basso (Low inoculation level).

b) Risultato MPN non affidabile: è molto improbabile che si verifichi una combinazione MPN. L'esperimento deve essere ripetuto.

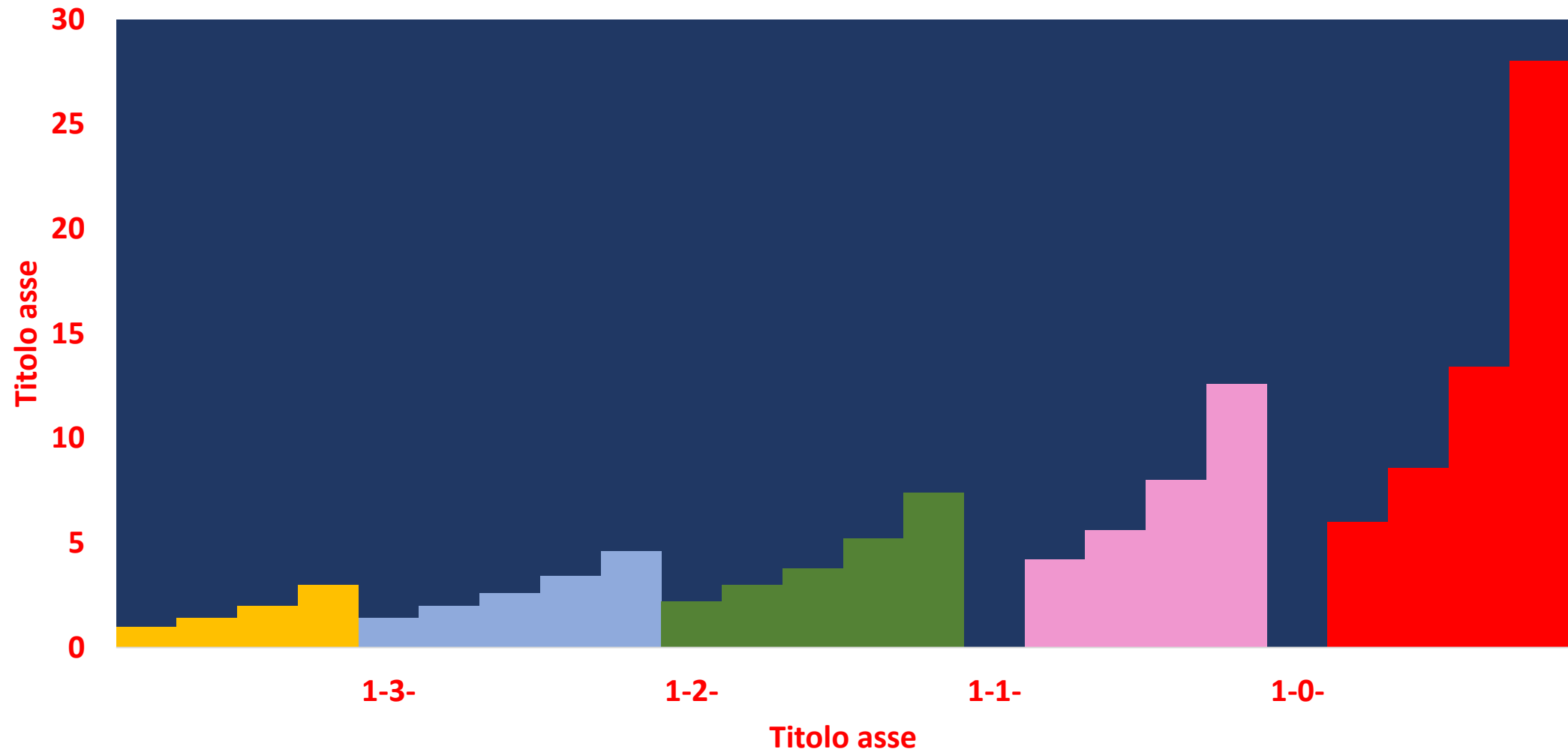
5.5.1 Determinazione dell' eLOD₅₀ in base al numero di risultati positivi per livelli di contaminazione con **prot. 1**

PROSPETTO 6	HIL	MIL	LIL	BIANCO	LOD ₅₀
	18	6	2	0	2,2
	1	4	3	0	

HIL	MIL	LIL	BIANCO	eLOD ₅₀ ufc/pp	
1/1	4/4	4/4	0/1	<1,0 x LIL	<1,0 x 2,2
1/1	4/4	3/4	0/1	=0,5 x LIL	1,1
1/1	4/4	2/4	0/1	=0,7 x LIL	1,54
1/1	4/4	1/4	0/1	=1,0 x LIL	2,2
1/1	4/4	0/4	0/1	=1,5 x LIL	3,3
1/1	3/4	4/4	0/1	=0,7 x LIL	1,54
1/1	3/4	3/4	0/1	=1,0 x LIL	2,2
1/1	3/4	2/4	0/1	=1,3 x LIL	2,86
1/1	3/4	1/4	0/1	=,17 x LIL	3,74
1/1	3/4	0/4	0/1	=2,3 x LIL	5,06
1/1	2/4	4/4	0/1	=1,1 x LIL	2,42
1/1	2/4	3/4	0/1	=1,5 x LIL	3,3
1/1	2/4	2/4	0/1	=1,9 x LIL	4,18
1/1	2/4	1/4	0/1	=2,6 x LIL	5,72
1/1	2/4	0/4	0/1	=3,7 x LIL	8,14
1/1	1/4	4/4	0/1	Risultato MPN non affidabile	//////////
1/1	1/4	3/4	0/1	=2,8 x LIL	6,16
1/1	1/4	2/4	0/1	=4,0 x LIL	8,8

Andamento dei valori di $eLOD_{50}$ in base alle positività delle PP

$eLOD_{50} \times 2 < 2,0$



5.5 Valutazione dei risultati

Accettabilità

Criterio:

$$e\text{LOD}_{50} \leq 4 \times \text{LOD}_{50}$$

$$1,1 \leq 4 \times 2,2$$

$$1,1 \leq 8,8$$

ACCETTABILE