

Anno 2013

**VI Circuito interlaboratorio
nazionale: isolamento
Salmonella spp. da campioni di
origine veterinaria, produzione
primaria**

VI

Circuito Interlaboratorio nazionale: isolamento *Salmonella* spp. da campioni di origine veterinaria_produzione primaria

ANNO 2013

1. Introduzione

Il presente report descrive i risultati del VI Circuito interlaboratorio relativo all'isolamento di *Salmonella* spp. da campioni di origine animale organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi (CRNS).

L'obiettivo principale del presente circuito interlaboratorio è quello di valutare la capacità dei laboratori partecipanti di identificare *Salmonella* presente a diversi livelli di contaminazione in campioni di origine animale della produzione primaria.

Inoltre dal confronto delle performance è possibile avere informazioni relativamente all'uniformità di conduzione della procedura di prova da parte dei laboratori partecipanti e se risultati comparabili possono essere ottenuti da tutti i laboratori che applicano la metodica di riferimento Annex D (2007) della ISO 6579:2002.

Per quanto riguarda la tipologia della matrice impiegata, considerando che le sovrascarpe rappresentano il metodo preferenziale per la collezione dei campioni di materiale fecale nell'ambito dei piani di controllo delle salmonelle attualmente in vigore, si è ritenuto opportuno utilizzare questa matrice addizionata con feci animali per testare le performance dei laboratori.

2. Laboratori Partecipanti

Al presente circuito hanno preso parte 33 laboratori, di cui 28 afferenti agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali e 5 laboratori privati. Di seguito (Tabella 1) viene riportata la lista dei laboratori partecipanti, ciascuno dei quali è stato identificato con un codice numerico assegnato arbitrariamente.

Laboratorio	Referente
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana – Roma – Struttura Diagnostica Generale	Dott.ssa Alessia Franco Dott. Andrea Caprioli
Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche – Perugia – Laboratorio di Diagnostica	Dott.ssa Paola Papa
Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche – Macerata	Dott. Gianni Perugini
Istituto Zooprofilattico della Sardegna – Sassari - Laboratorio di Batteriologia	Dott. Stefano Lollai
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Palermo – Sezione Diagnostica	Dott. Domenico Vicari
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Barcellona	Dott. Vincenzo di Marco lo Presti
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Caltanissetta	Dott. Francesco Campo
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Catania	Dott. Antonio Salvaggio
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Ragusa	Dott. Francesco Antoci
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno – Portici (NA) – UOS di Diagnostica	Dott.ssa Anna Cerrone
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno – Catanzaro – Sezione Diagnostica	Dott.ssa Caterina Rivero
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno –Salerno - Sezione Diagnostica	Dott. ssa Esterina De Carlo
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise “G. Caporale” – Teramo – Reparto di Microbiologia Diagnostica	Dott. Andrea Di Provvio
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d’Aosta – Torino – Laboratorio di Patologia Animale e Stabulario	Dott.ssa Carla Grattarola
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna – Sezione Diagnostica di Brescia	Dott. Giovanni Alborali

Tabella 1. Elenco dei Laboratori partecipanti al Circuito

Laboratorio	Referente
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata – Foggia – Laboratorio di Diagnostica Generale	Dott. Pasquale Troiano
Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata – Putignano	Dott. ssa Nicoletta Addante
Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata – Brindisi	De Bellis Lorenzo
Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata – Taranto	Dott. ssa Laura Guarino Dott. ssa Roberta Catanzariti
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno – Cosenza	Dott. ssa Mancuso Giulia
Gesco Consorzio Cooperativo S.C.A - Cazzago S. M.	Dott. ssa Raffaella Ceruti
Gesco Consorzio Cooperativo S.C.A - San Vittore di Cesena	Dott. ssa Maria Pia Balestri
Gesco Consorzio Cooperativo S.C.A - Mosciano S. Angelo	Dott. ssa Erminia di Francesco
Studio Summit s.rl	Dott. ssa Gilda Storti
Agricola Tre Valli	Dott. Luigi Sperati Ruffoni
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie	Referente
Sezione Diagnostica di Treviso	Dott. Fabrizio Agnoletti
Sezione Diagnostica di Pordenone	Dott. ssa Gabriella Conedera
Sezione Diagnostica di Padova	Dott. Luciano Iob
Sezione Diagnostica di Vicenza	Dott. Antonio Barberio
Sezione Diagnostica di Verona	Dott. Nicola Pozzato
Sezione Diagnostica di Bolzano	Dott.ssa Karin Trevisiol
Sezione Diagnostica di Trento	Dott. Giovanni Farina
Sezione Diagnostica di Udine	Dott. ssa Monia Cocchi

Tabella 1 (continua). Elenco dei Laboratori partecipanti al Circuito

3. Materiali e metodi

Campioni

Il materiale di riferimento utilizzato nel presente circuito è stato acquistato presso la Health Protection Agency (UK). Sono state fornite lenticules contenenti diverse concentrazioni di *Salmonella* spp. Nello specifico sono state impiegate lenticules “bianche” (non contenenti alcun microrganismo), lenticules contenenti 132 ufc (unità formanti colonia) di *Salmonella* Enteritidis (SE) e lenticules contenenti rispettivamente 13 e 51 ufc di *Salmonella* Typhimurium (STM).

Una volta ricevuto il materiale di riferimento dalla ditta produttrice si è provveduto a conservarlo a -20 ± 6 °C, temperatura che permette di garantirne la stabilità delle lenticules per lunghi periodi. Tale materiale può comunque essere conservato, secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice per brevi periodi (2-3 settimane) a temperatura di refrigerazione, senza che ciò comporti un'alterazione della caratteristiche carica infettante.

I dischetti di riferimento sono stati forniti dalla ditta produttrice con documentazione atta a certificare la contaminazione media di ciascun lotto, calcolata valutando la contaminazione di 30 dischetti per lotto.

Per quanto riguarda il materiale ambientale, le feci sono state raccolte dal servizio veterinario locale presso un allevamento di bovine da latte risultato negativo per *Salmonella* spp. La scelta di utilizzare feci bovine è stata conseguente ad oggettive difficoltà di reperire materiale fecale avicolo, considerata la situazione di emergenza legata all'identificazione di focolai di influenza aviaria al momento del reperimento del materiale utile al presente circuito.

Il materiale fecale una volta recapitato presso il CRNS, è stato omogenato e successivamente suddiviso in aliquote. Da ciascuna aliquota sono stati prelevati 25 g di campione e si è proceduto alla ricerca di *Salmonella* spp. secondo l'Annex D della ISO 6579:2002. Le analisi eseguite hanno dato esito negativo per *Salmonella* spp.

Inoltre, sul materiale fecale è stata eseguita la numerazione della carica Mesofila Totale (ISO 4833:2003) e degli Enterobatteri (ISO 21528-2:2004). I risultati delle analisi eseguite in data 26/06/2013 sono stati rispettivamente i seguenti: 3.100.000 ufc/g (carica mesofila totale) e 1.300.000 (Enterobacteriaceae).

Le aliquote di feci destinate ai singoli partecipanti sono state conservate in sacchetti sigillati, mantenuti a temperatura di congelamento fino al momento della spedizione.

Ciascun laboratorio ha analizzato 20 campioni in totale, così suddivisi: 10 campioni costituiti da un paio di sovrascarpe addizionato con 5 grammi di feci bovine a cui aggiungere un dischetto contenente STM o SE o non contenente alcun microrganismo (“bianco”); 10 controlli di cui 8 rappresentati da un paio di sovrascarpe senza feci a cui aggiungere i dischetti (STM, SE o bianco) e

2 controlli di processo. Il materiale di riferimento destinato a ciascun laboratorio partecipante è stato preparato siglando ciascuna provetta (contenente un singolo dischetto) con il codice identificativo di ogni campione. In particolare, sono stati siglati con numeri progressivi da 1 a 10 i dischetti da utilizzare per allestire i campioni artificialmente contaminati, con codici da C1 a C8 i dischetti da impiegare per allestire i controlli e con i codici C9 e C10 i due controlli di processo, ovvero un campione sovrascarpe-feci ed un campione solo sovrascarpe, entrambi da analizzare senza l'aggiunta di alcun dischetto.

Riassumendo, ad ogni laboratorio è stato inviato il seguente materiale:

- 8 lenticules “controllo” (da aggiungere alle sovrascarpe prive di feci) numerate da C1 a C8;
- 1 paio di sovrascarpe addizionato con 5 g di feci, numerato C9;
- 1 paio di sovrascarpe, numerato C10;
- 10 lenticules numerate da 1 a 10 da testare in combinazione con sovrascarpe-feci.

La tipologia e il numero di lenticules da testare con l'aggiunta di sovrascarpe-feci o solo sovrascarpe sono riportate in Tabella 2.

Lenticules	Lenticules controllo (n=8) Da aggiungere alle sovrascarpe	Lenticules campione (n=10) Da aggiungere alle sovrascarpe-feci
S. Enteritidis 132 (SE 132)	2	2
S. Typhimurium 13 (STM 13)	3	2
S. Typhimurium 51 (STM 51)	1	3
Bianco	2	3

Tabella 2. Tipo e numero di lenticules testate

Il materiale per l'esecuzione del circuito è stato inviato agli Istituti e ai laboratori privati tramite un corriere specializzato per il trasporto di materiale biologico, mentre la consegna del materiale alle sezioni territoriali dell'IZSVE è avvenuta tramite il servizio interno dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

Documenti trasmessi ai laboratori partecipanti e calendario delle attività

A ciascun laboratorio partecipante è stata inviata, anticipatamente rispetto all'esecuzione delle analisi, la seguente documentazione:

- Protocollo del Circuito Interlaboratorio per l'Isolamento di *Salmonella* spp. (Allegato 1), con indicazioni relative alla tipologia di materiale consegnato e alle modalità di conservazione;
- Procedura operativa (PO) del Circuito Interlaboratorio per l'Isolamento di *Salmonella* spp. (Allegato 2) riguardante la modalità di preparazione dei campioni e la procedura da utilizzare per l'esecuzione della prova;
- Test Report, in cui ciascun laboratorio riporta le informazioni relative alla prova e ai risultati ottenuti (Allegato 3);
- Scheda di Sicurezza del Circuito (Allegato 4).

Le attività pianificate nell'ambito del circuito sono state svolte secondo la tempistica definita nel calendario trasmesso dal CRNS ai laboratori partecipanti nella terza settimana di ottobre 2013, mentre il materiale per lo svolgimento della prova è stato inviato nella settimana dall'11 al 15 novembre 2013. Il circuito infine è stato effettuato a partire dal 18 novembre 2013.

4. Analisi statistica dei dati

Specificità, sensibilità e accuratezza ottenute complessivamente dai laboratori partecipanti analizzando i campioni di controllo e i campioni di prova artificialmente contaminati sono state calcolate come indicato di seguito.

$$\text{Specificità:} \quad \frac{\text{Numero di risultati negativi}}{\text{Numero totale di campioni realmente negativi}} \quad \times 100\%$$

$$\text{Sensibilità:} \quad \frac{\text{Numero di risultati positivi}}{\text{Numero totale di campioni realmente positivi}} \quad \times 100\%$$

$$\text{Accuratezza:} \quad \frac{\text{Numero di risultati corretti (positivi e negativi)}}{\text{Numero totale di campioni (positivi e negativi)}} \quad \times 100\%$$

Sono state inoltre sottoposte a verifica tutte le informazioni trasmesse mediante i test report dai partecipanti, al fine di evidenziare eventuali anomalie nell'esecuzione del protocollo.

5. Criteri per la definizione di “buona performance”

Nella tabella seguente sono riportati i criteri stabiliti dal CRNS per la definizione della "buona performance" dei laboratori partecipanti al presente circuito. Per la definizione dei criteri di conformità sono stati considerati i risultati ottenuti tramite l'impiego del terreno MSR/V e delle combinazioni dei terreni selettivi utilizzati da ciascun laboratorio. Ad esempio, nel caso in cui un laboratorio avesse riscontrato una positività in un campione mediante l'impiego di MSR/V/XLD, ma non con il secondo terreno selettivo, il risultato relativo a quel campione è stato comunque considerato conforme.

In tabella 3-a vengono riportati i limiti di accettabilità relativi ai campioni e controlli addizionati con le lenticole contaminate, mentre in tabella 3-b sono indicati i limiti di accettabilità relativi ai campioni e controlli "bianchi".

CONTROLLI	Limiti di accettabilità	
	% positivi	N° campioni positivi/ N° totale di campioni
SE 132 ufc + STM 51 ufc STM 13 ufc	100% ~ 67%	3/3 2/3
CAMPIONI	% positivi	N° campioni positivi/ N° totale di campioni
SE 132 ufc + STM 51 ufc STM 13 ufc	80% 50%	4/5 1/2

Tabella 3-a. Criteri di conformità per campioni e controlli artificialmente contaminati

CONTROLLI	Limiti di accettabilità	
	% positivi	N° campioni positivi/ N° totale di campioni
Bianchi	25% **	1/4*
CAMPIONI	% positivi	N° campioni positivi/ N° totale di campioni
Bianchi	~33%	1/3***

Tabella 3-b. Criteri di conformità per campioni e controlli non contaminati

* Sono stati considerati sia i controlli rappresentati dalle capsule “bianco” che i controlli sovrascarpe-APTS e sovrascarpe-feci-APTS

** La tolleranza sulla positività è limitata al solo controllo sovrascarpe-feci-APTS

*** Tutti i campioni bianchi dovrebbero essere stati identificati come negativi, ma dal momento che non c'è al 100% la garanzia che tutti i lotti di feci inviati ai laboratori per il circuito fossero negativi per Salmonella è stato considerato come accettabile un esito positivo per uno dei tre campioni bianchi testati.

6. Risultati

Dati tecnici

I terreni utilizzati dai singoli partecipanti sono riportati in Tabella 4. Tutti i laboratori hanno utilizzato l'MSRV come terreno di arricchimento selettivo e l'XLD come primo terreno selettivo-differenziale, conformemente a quanto indicato nella Procedura Operativa.

Per quanto riguarda il secondo terreno selettivo-differenziale, il BGA è stato utilizzato da 16 laboratori, il Rambach da 8 laboratori, il Brilliance Salmonella Agar da 3 laboratori, l'SS Agar da 2 laboratori ed infine, 2 laboratori hanno impiegato un terreno cromogenico. Due laboratori non hanno indicato il secondo terreno selettivo differenziale utilizzato.

Per quanto riguarda le prove biochimiche, 13 laboratori hanno utilizzato esclusivamente un kit commerciale, un laboratorio ha eseguito la conferma biochimica solo in TSI-A, un laboratorio ha eseguito solamente TSI-A, UA e LISINA, mentre i rimanenti 19 laboratori hanno fatto uso sia di prove biochimiche in macrometodo che di kit commerciali di conferma biochimica.

Codice del laboratorio	Terreno di arricchimento selettivo-differenziale	Prove di conferma biochimica
S1	XLD, non indicato	TSI-A, UA, LISINA, TTM, ONPG, VOGES PROSKAUER
S2	XLD, Cromogenico per Salmonella	TSI-A, UA, LISINA, TTM, ONPG, VOGES PROSKAUER
S3	XLD, Cromogenico per Salmonella	API ID 32 E (Biomerieux)
S4	XLD, SS agar	TSI-A, API 20 E (Biomerieux)
S5	XLD, BGA	TSI-A, UA, LISINA, TTM, ONPG, VOGES PROSKAUER
S6	XLD, BGA	TSI-A, UA, API 20 E (Biomerieux)
S7	XLD, SS agar	TSI-A, API 20 E (Biomerieux)
S8	XLD, BGA	TSI-A, API 20 E (Biomerieux)
S9	XLD, BGA	TSI-A, API 20 E (Biomerieux)
S10	XLD, BGA	CARD GN (VITEK 2 SYSTEM)
S11	XLD, BSA	TSI-A
S12	XLD, BSA	VITEK

Tabella 4. Terreni di arricchimento selettivo, terreni di arricchimento selettivo-differenziale e prove di conferma biochimica utilizzati dai singoli laboratori partecipanti

Codice del laboratorio	Terreno di arricchimento selettivo-differenziale	Prove di conferma biochimica
S13	XLD, RAMBACH	TSI-A, UA, API 20 E (Biomerieux)
S14	XLD, BGA	TSI-A, API 20 E (Biomerieux)
S15	XLD, BGA	TSI-A, UA, ONPG, ENTEROTUBE
S16	XLD, RAMBACH	TSI-A, UA, LISINA
S17	XLD, RAMBACH	TSI-A, API 20 E (Biomerieux)
S18	XLD, RAMBACH	TSI-A, API 20 E (Biomerieux), OSSIDASI
S19	XLD, RAMBACH	TSI-A, API 20 E (Biomerieux)
S20	XLD, BSA	VITEK 2 GN
S21	XLD, BGA	API 20 E (Biomerieux)
S22	XLD, RAMBACH	API 20 E (Biomerieux)
S23	XLD, RAMBACH	API 20 E (Biomerieux)
S24	XLD, RAMBACH	API 20 E (Biomerieux)
S25	XLD, BGA	TSI-A, MICROBACT 12 A (OXOID)
S26	XLD, BGA	API 20 E (Biomerieux)
S27	XLD, BGA	TSI-A, API 20 E (Biomerieux)
S28	XLD, BGA	TSI-A, UA, LISINA, TTM, ONPG, VOGES PROSKAUER
S29	XLD, BGA	API 20 E (Biomerieux)
S30	XLD, non indicato	API 20 E (Biomerieux)
S31	XLD, BGA	TSI-A, UA, LISINA, API 20 E (Biomerieux), API 10 S (Biomerieux)
S32	XLD, BGA	TSI-A, UA, LISINA, TTM, ONPG, VOGES PROSKAUER
S33	XLD, BGA	API 20 E (Biomerieux)

Tabella 4 (continua). Terreni di arricchimento selettivo, terreni di arricchimento selettivo-differenziale e prove di conferma biochimica utilizzati dai singoli laboratori partecipanti

Di seguito (Tabella 5) vengono riportate le principali deviazioni rispetto all'Annex D ISO 6579:2002 riscontrate nei test report compilati dai laboratori partecipanti.

Codice laboratorio	Pre-arricchimento (APTS)		Arricchimento selettivo (MSRV)	
	Tempo d'incubazione (h:min)	Temperatura d'incubazione in °C (min-max)	Tempo d'incubazione (h:min)	Temperatura d'incubazione in °C (min-max)
Annex D ISO 6579:2002	16-20	36-38	(24 ± 3) + (24 ± 3)	40,5 – 42,5
S2	21:00	37,32	21:00 + 23:21	41,9
S3	21:00	37±1	48:00	41,17 – 41,15
S5	18:00	37	24:00 + 48:00	42
S8	23:00	37	23:30 + 22:30	42
S11	21:00	37	23:00 + 24:00	41,5
S12	25:10	37	22:00 + ()	42
S13	21:00	37 – 37,1	24:00 + 24:00	37 – 37,1
S15	20:35	37,1 – 37,5	23:25 + 23:40	41,6 – 42
S16	22:00	36,7	24:00 + 23:45	42
S17	21:55	36,8	22:50 + 23:40	41,9 – 42
S18	22:00	37	24 :00 + 23:00	41,5
S20	21:30	37	24:30 + 23:30	41,5
S24	22:50	37	24:44 + ()	42
S28	20:55	36,3 – 36,4	24:06 + 23:28	40 – 40,6

Tabella 5. Tempi e temperature d'incubazione delle fasi di prearricchimento e arricchimento selettivo
Celle grigie: tempi e temperature che si discostano dall'Annex D

Come si può osservare, 13 laboratori (codici identificativi S2, S3, S8, S11, S12, S13, S15, S16, S17, S18, S20, S24, S28) hanno prolungato il pre-arricchimento in APTS oltre la tempistica prevista dall'Annex D (18 ± 2 ore).

Un laboratorio (codice identificativo S5) ha prolungato i tempi d'incubazione previsti nella fase di arricchimento selettivo (MSRV), non rispettando le tempistiche previste dall'Annex D.

Due laboratori (codici identificativi S13 e S28) non hanno rispettato il limite minimo del range di temperatura d'incubazione dell'MSRV previsto dalla procedura ($40,5 - 42,5$ °C): in un caso l'incubazione del terreno di arricchimento selettivo è stata effettuata a 37°C anzichè $41,5 \pm 1$ °C.

Campioni controllo

Risultati campioni controllo C9-C10

Tutti i laboratori hanno identificato correttamente i controlli C9 e C10.

Campioni di controllo "bianco" (n=2)

I campioni di controllo contaminati con dischetto bianco (non contenente *Salmonella* spp.) sono stati identificati come negativi da 31 su 33 laboratori partecipanti. Dei restanti due laboratori, uno (codice identificativo S15) ha identificato come positivo uno dei due campioni, mentre l'altro (codice identificativo S8) ha riscontrato una positività in entrambi i campioni di controllo.

Campioni di controllo Salmonella Enteritidis 132 ufc (n=2)

Tutti i 33 laboratori hanno identificato correttamente i due campioni di controllo contaminati con dischetto di SE 132 ufc.

Campioni di controllo Salmonella Typhimurium 13 ufc (n=3)

Tutti i 33 laboratori hanno identificato correttamente i tre campioni di controllo contaminati con dischetto di STM 13 ufc.

Campioni di controllo Salmonella Typhimurium 51 ufc (n=1)

Tutti i 33 laboratori hanno identificato correttamente i tre campioni di controllo contaminati con dischetto di STM 51 ufc.

In tabella 6 vengono riportate le percentuali di specificità, sensibilità ed accuratezza dei campioni di controllo.

CAMPIONI DI CONTROLLO		MSRV
Dischetti “bianchi” (2 per lab) + controllo sovrascarpe - APTS + controllo sovrascarpe-feci – APTS	N° di campioni	132
	Campioni negativi	129
	Specificità in %	97,7%
SE 132 ufc/dischetto (2 per lab)	N° di campioni	66
	Campioni positivi	66
	Sensibilità in %	100%
STM 13 ufc/dischetto (3 per lab)	N° di campioni	99
	Campioni positivi	99
	Sensibilità in %	100%
STM 51 ufc/dischetto (1 per lab)	N° di campioni	33
	Campioni positivi	33
	Sensibilità in %	100%
Tutti i dischetti contaminati con Salmonella	N° di campioni	198
	Campioni positivi	198
	Sensibilità in %	100%
Tutti i controlli	N° di campioni	330
	Campioni corretti	327
	Accuratezza in %	99,1%

Tabella 6. Valori di specificità, sensibilità e accuratezza complessivi ottenuti valutando le performance ottenute dai laboratori partecipanti (33) sui campioni controllo (sovrascarpe senza feci)

Per quanto riguarda i controlli, il valore percentuale di specificità ottenuto dai laboratori partecipanti è pari al 97,7%, mentre la sensibilità è risultata pari al 100% per tutti i livelli di contaminazione con *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium*.

Ne consegue che la sensibilità complessiva ottenuta per i campioni controllo contenenti *Salmonella* spp. è risultata pari al 100% e l'accuratezza pari al 99,1%.

Campioni artificialmente contaminati

Dischetti bianchi (n=3)

I tre campioni (sovrascarpe-feci) contaminati con “dischetti bianchi” sono stati identificati come negativi da 28 su 33 laboratori partecipanti. Quattro laboratori (codici identificativi S2, S6, S15, S18) hanno riscontrato due campioni positivi su tre ed un laboratorio (codice identificativo S7) ha identificato come positivo un campione su tre.

Dischetti Salmonella Enteritidis 132 ufc (n=2)

31 laboratori su 33 hanno fornito esito positivo per il campione contaminato con SE 132 ufc. Dei restanti due laboratori, uno (codice identificativo S13) ha identificato correttamente un campione su due, mentre l'altro (codice identificativo S28) non ha riscontrato alcuna positività.

Dischetti Salmonella Typhimurium 13 ufc (n=2)

32 laboratori su 33 hanno fornito esito positivo per i due campioni contaminati con ST 13 ufc. Un laboratorio (codice identificativo S1) ha identificato un campione positivo su due.

Dischetti Salmonella Typhimurium 51 ufc (n=3)

29 laboratori su 33 hanno fornito esito positivo per i tre campioni contaminati con ST 51 ufc. Dei restanti quattro laboratori, tre laboratori (codici identificativi S1, S2, S7) hanno individuato la positività in due campioni su tre mentre uno (codice identificativo S28) ha identificato correttamente un campione su tre.

In tabella 7 sono riportati i valori di sensibilità, specificità e accuratezza dei campioni sovrascarpe-feci a cui sono stati addizionati i dischetti.

CAMPIONI DI PROVA		MSRV
Dischetti “bianchi” (3 per lab)	N° di campioni	99
	Campioni negativi	93
	Specificità in %	93,9%
SE 132 ufc/dischetto (2 per lab)	N° di campioni	66
	Campioni positivi	63
	Sensibilità in %	95,5%
STM 13 ufc/dischetto (2 per lab)	N° di campioni	66
	Campioni positivi	65
	Sensibilità in %	98,5%
STM 51 ufc/dischetto (3 per lab)	N° di campioni	99
	Campioni positivi	94
	Sensibilità in %	95%
Tutti i dischetti contaminati con Salmonella	N° di campioni	231
	Campioni positivi	222
	Sensibilità in %	96,1%
Tutti i dischetti	N° di campioni	330
	Campioni corretti	315
	Accuratezza in %	95,5%

Tabella 7. Valori di specificità, sensibilità e accuratezza complessivi ottenuti valutando le performance ottenute dai laboratori partecipanti (33) sui campioni sovrascarpe-feci-lenticules

Il valore percentuale di specificità ottenuto dai laboratori partecipanti è pari al 93,9%. Valutando singolarmente i diversi sierotipi e i livelli di contaminazione si nota che la sensibilità maggiore si ha per STM 13 ufc (98,5%), seguita da SE 132 ufc e STM 51 ufc (95,5% e 95% rispettivamente). Complessivamente, per tutti i campioni artificialmente contaminati è stato ottenuto un valore di sensibilità pari al 96,1%, mentre per quanto riguarda l'accuratezza è stato registrato un valore pari al 95,5%.

Di seguito (Tabella 8) vengono sintetizzati per ciascun laboratorio, i risultati prendendo in considerazione sia i controlli che i campioni artificialmente contaminati ed i relativi livelli di contaminazione, che il rispetto del protocollo.

Codice laboratorio	CAMPIONI				CONTROLLI				Conformità protocollo
	Bianchi (n=3)	SE 132 ufc (n=2)	STM 13 ufc (n=2)	STM 51 ufc (n=3)	Bianchi (n=4)	SE 132 ufc (n=2)	STM 13 ufc (n=3)	STM 51 ufc (n=1)	
S1	3	2	1	2	4	2	3	1	SI
S2	2	2	2	2	4	2	3	1	NO
S3	3	2	2	3	4	2	3	1	NO
S4	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S5	3	2	2	3	4	2	3	1	NO
S6	2	2	2	3	4	2	3	1	SI
S7	1	2	2	2	4	2	3	1	SI
S8	3	2	2	3	2	2	3	1	NO
S9	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S10	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S11	3	2	2	3	4	2	3	1	NO
S12	3	2	2	3	4	2	3	1	NO
S13	3	1	2	3	4	2	3	1	NO
S14	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S15	2	2	2	3	3	2	3	1	NO
S16	3	2	2	3	4	2	3	1	NO
S17	3	2	2	3	4	2	3	1	NO
S18	2	2	2	3	4	2	3	1	NO
S19	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S20	3	2	2	3	4	2	3	1	NO
S21	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S22	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S23	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S24	3	2	2	3	4	2	3	1	NO
S25	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S26	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S27	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S28	3	0	2	1	4	2	3	1	NO
S29	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S30	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S31	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S32	3	2	2	3	4	2	3	1	SI
S33	3	2	2	3	4	2	3	1	SI

Tabella 8. Numero di campioni correttamente identificati da ciascun laboratorio partecipante. In grigio vengono evidenziate eventuali discordanze con i risultati attesi.

Valutazione della performance dei laboratori partecipanti

Per quanto riguarda il soddisfacimento dei criteri stabiliti per la definizione di “buona performance” è stata valutata la conformità ai criteri definiti per i controlli e per i campioni (Tabelle 3-a e 3-b). Il riassunto delle conformità viene illustrato in Tabella 9.

Codice Laboratorio	Conformità ai criteri definiti per i controlli	Conformità ai criteri definiti per i campioni
S1	SI'	SI'
S2	SI'	SI'
S3	SI'	SI'
S4	SI'	SI'
S5	SI'	SI'
S6	SI'	SI'
S7	SI'	NO
S8	NO	SI'
S9	SI'	SI'
S10	SI'	SI'
S11	SI'	SI'
S12	SI'	SI'
S13	SI'	SI'
S14	SI'	SI'
S15	NO	SI'
S16	SI'	SI'
S17	SI'	SI'
S18	SI'	SI'
S19	SI'	SI'
S20	SI'	SI'
S21	SI'	SI'
S22	SI'	SI'
S23	SI'	SI'
S24	SI'	SI'
S25	SI'	SI'
S26	SI'	SI'
S27	SI'	SI'
S28	SI'	NO
S29	SI'	SI'
S30	SI'	SI'
S31	SI'	SI'
S32	SI'	SI'
S33	SI'	SI'

Tabella 9. Conformità dei singoli laboratori partecipanti ai criteri di buona performance

Osservando la tabella si può notare come su 33 laboratori partecipanti due non abbiano soddisfatto i criteri di conformità definiti rispettivamente per i campioni (codici identificativi S7 e S28) e per i controlli (laboratori S8 e S15). Tutti gli altri laboratori hanno soddisfatto i criteri di conformità stabiliti dall'ente organizzatore.

Monitoraggio delle temperature di trasporto

Come riportato nel Protocollo (Allegato 1), in ogni confezione spedita ai laboratori partecipanti è stato inserito un dispositivo (data logger) in grado di registrare la temperatura durante il trasporto. La durata del trasporto è stata calcolata in base alla data e all'ora di partenza dei campioni dal CRNS e ai dati relativi all'inizio dello stoccaggio riportati nel test report (Allegato 3) da ciascun laboratorio. Si riporta di seguito una tabella riassuntiva che mostra la distribuzione per laboratorio delle registrazioni di temperatura secondo cinque classi: < 0 °C, 0 – 5 °C, 5 – 10 °C, 10 – 15 °C e > 15 °C.

Codice Laboratorio	< 0 °C (n; %)	0 - 5 °C (n; %)	5 - 10 °C (n; %)	10 - 15 °C (n; %)	> 15 °C (n; %)	Totale
S1	- -	114 69,09	45 27,27	5 3,03	1 0,61	165
S2	- -	133 99,25	1 0,75	- -	- -	134
S3	- -	139 98,58	2 1,42	- -	- -	141
S4	- -	172 57,14	128 42,52	1 0,33	- -	301
S5	- -	264 91,67	23 7,99	1 0,35	- -	288
S6	- -	163 55,25	131 44,41	1 0,34	- -	295
S7	- -	142 49,13	146 50,52	1 0,35	- -	289
S8	- -	298 95,51	14 4,49	- -	- -	312
S9	- -	128 42,95	170 57,05	- -	- -	298
S10	- -	151 98,05	3 1,95	- -	- -	154
S11	- -	252 84,85	38 12,79	6 2,02	1 0,34	297
S12	- -	282 97,92	6 2,08	- -	- -	288
S13	- -	136 49,82	110 40,29	27 9,89	- -	273

Codice Laboratorio	< 0 °C (n; %)	0 - 5 °C (n; %)	5 - 10 °C (n; %)	10 - 15 °C (n; %)	> 15 °C (n; %)	Totale
S14	- -	129 97,73	3 2,27	- -	- -	132
S15	- -	160 96,97	4 2,42	1 0,61	- -	165
S16	- -	93 60,00	45 29,03	11 7,10	6 3,87	155
S17	- -	287 98,63	4 1,37	- -	- -	291
S19	- -	223 70,35	91 28,71	3 0,95	- -	317
S20	- -	357 70,41	142 28,01	7 1,38	1 0,20	507
S21	- -	312 99,05	3 0,95	- -	- -	315
S22	28 19,44	116 80,56	- -	- -	- -	144
S23	- -	124 91,85	10 7,41	1 0,74	- -	135
S24	- -	273 100,00	- -	- -	- -	273
S25	33 18,97	141 81,03	- -	- -	- -	174
S26	- -	128 85,91	19 12,75	2 1,34	- -	149
S27	- -	125 86,81	19 13,19	- -	- -	144
S29	- -	119 91,54	9 6,92	2 1,54	- -	130
S31	- -	124 86,11	20 13,89	- -	- -	144
S32	- -	135 90,00	15 10,00	- -	- -	150
S33	- -	120 86,96	18 13,04	- -	- -	138
Totale	61	5340	1219	69	9	6698

Tabella 10. Distribuzione delle misure di temperatura (n: numero di misurazioni; %), per laboratorio

In tabella 10 vengono riportati i risultati relativi a 30 dei 33 laboratori partecipanti al circuito: un laboratorio (codice identificativo S28) ha ricevuto il materiale del circuito direttamente dal CRNS e non, quindi, tramite corriere mentre nel caso di due laboratori (codici identificativi S18 e S30) non è stato possibile recuperare i data-logger.

Dalle misurazioni acquisite si può notare (Figura 1) che, circa l'80% delle temperature misurate sono comprese tra 0 - 5 °C seguite dalla classe 5 - 10 °C (18% dei casi).

Andando ad analizzare il trend dei singoli laboratori si è potuto riscontrare la presenza ricorrente di un picco di temperatura in corrispondenza dell'intervallo di trasporto; ciò porta a supporre che, non essendo l'aumento di temperatura caratterizzato da una certa gradualità, l'inclusione di registrazioni sopra i 5 °C non sia da imputare ad una scorretta procedura di trasporto quanto, più probabilmente, ad una non corretta compilazione del modulo fornito per l'identificazione della fine del periodo di trasporto e, conseguentemente, ad un'erronea delimitazione dell'intervallo stesso.

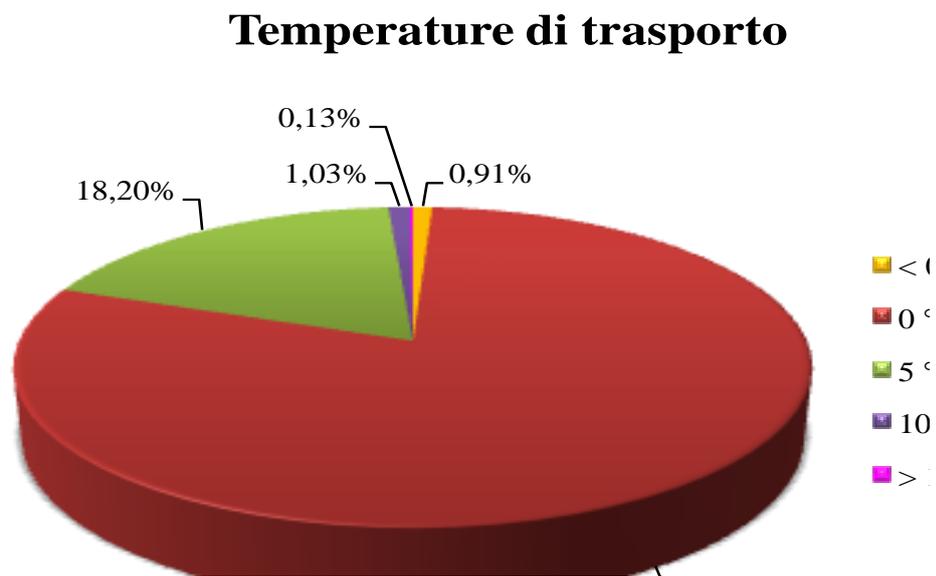


Figura 1 Distribuzione delle misure di temperatura (%)

E' bene evidenziare, tuttavia, che nei laboratori in cui sono state registrate delle non conformità, e di cui risultavano disponibili le misurazioni (codici identificativi S8 e S15) non è stata riscontrata alcuna anomalia in fase di trasporto, dal momento che tutte le misure registrate nell'intervallo considerato sono risultate inferiori ai 5 °C.

6. Conclusioni

- Il numero dei laboratori partecipanti al sesto circuito isolamento è incrementato rispetto all'anno precedente passando da 25 a 33 laboratori;
- La temperatura di trasporto del materiale necessario all'esecuzione del test, si è attestata nell'80 % dei casi tra i 0 e 5 °C;
- I campioni di controllo "bianchi" hanno fatto registrare un valore di specificità vicino a quello dell'anno precedente e pari al 97,7%, mentre nel caso dei campioni controllo artificialmente contaminati con *Salmonella* spp. la sensibilità è stata pari al 100%;
- La percentuale di specificità dei campioni sovrascarpe-feci a cui sono stati addizionati i dischetti bianchi è risultata pari al 93,9%. Pertanto è stato registrato un numero discreto di errori relativi all'identificazione di *Salmonella* per campioni contaminati con lenticules "bianche"
- Per i campioni sovrascarpe-feci artificialmente contaminati con dischetti di *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, la sensibilità complessiva è risultata pari al 96,1%;
- Per quanto concerne il rispetto delle indicazioni tecniche riportate nell'Annex D, la durata della fase di pre-arricchimento non è stata rispettata da 13 dei 33 laboratori partecipanti;
- In conclusione, le "criticità" riscontrate nel corso di questo sesto circuito sono state: l'incorretta identificazione dei campioni negativi (bianchi) sia per i campioni che per i controlli ed il mancato rispetto del protocollo nella fase di prearricchimento non selettivo per un consistente numero di partecipanti.

ALLEGATO 1

PROTOCOLLO

CIRCUITO INTERLABORATORIO VI (2013) ISOLAMENTO DI SALMONELLA SPP.

Organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi

Obiettivi ed indicazioni generali

Il presente circuito interlaboratorio relativo all'isolamento di *Salmonella* spp. è stato organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi (CRNS) con lo scopo di testare l'abilità dei laboratori partecipanti di identificare la presenza *Salmonella* spp. in campioni di origine animale.

La metodica di riferimento da utilizzarsi nell'ambito di questo studio è quella riportata nel documento ISO 6579:2002/Amd 1 2007 che si applica specificatamente all'identificazione di *Salmonella* spp. in campioni di feci di origine animale ed in campioni di tipo ambientale prelevati a livello di produzione primaria.

Poiché le sovrascarpe rappresentano il metodo preferenziale per la collezione dei campioni di materiale fecale nell'ambito dei piani di controllo delle salmonelle attualmente in vigore, il circuito di quest'anno prevede di utilizzare questa matrice addizionata con feci animali per testare le performance dei laboratori.

Indipendentemente dal protocollo prescritto, i laboratori coinvolti potranno utilizzare in parallelo metodi alternativi usati comunemente, con l'attenzione di indicare nell'apposita scheda (Test Report) i dettagli relativi alla procedura aggiuntiva eseguita.

Per quanto riguarda i campioni da sottoporre ad indagine verrà utilizzato materiale di riferimento certificato, acquistato presso la Health Protection Agency (UK), e feci di bovino negative per *Salmonella* spp.

La scelta di utilizzare feci bovine è conseguente ad oggettive difficoltà a reperire materiale fecale avicolo, considerata la situazione emergenziale legata all'identificazione di focolai di influenza aviaria al momento del reperimento del materiale utile al presente circuito.

Il materiale di riferimento consiste di dischetti contenenti quantità standard (due diversi livelli di contaminazione) di *Salmonella* Typhimurium (STM) o *Salmonella* Enteritidis (SE) e capsule “bianche” non contaminate.

Ciascun laboratorio esaminerà 10 campioni costituiti da un paio di sovrascarpe addizionate con 5 grammi di feci bovine ed ulteriormente contaminate con un dischetto contenente STM o SE o non contenente alcun microrganismo e 10 controlli di cui 2 controlli di processo e gli 8 rimanenti costituiti da un paio di sovrascarpe contaminate con dischetti in assenza di feci.

Il materiale verrà confezionato in un pacco contenente 2 diversi sacchetti, uno con il materiale di riferimento (dischetti) l'altro con i sacchetti con le sovrascarpe (sacchetti siglati da 1 a 10 e C9 contenenti sovrascarpe addizionate con le feci e i sacchetti siglati da C1 a C10 contenenti sovrascarpe non addizionate con feci). Il laboratorio ricevente dovrà segnalare al più presto eventuali problemi riscontrati all'apertura delle confezioni.

Inoltre al fine di monitorare la temperatura durante il trasporto nella confezione verrà inserito un registratore di temperatura (data logger) identificato con il codice del laboratorio partecipante. Il laboratorio partecipante avrà cura di rispedire al CRNS il data logger tramite la busta pre-intestata.

Il materiale verrà inviato tramite corriere. Ciascun laboratorio coinvolto dovrà contattare urgentemente il CRNS in caso di mancato recapito entro 3 giorni lavorativi dalla data di spedizione prevista.

Modalità operative:

Ciascun laboratorio partecipante riceverà un pacco contenente 2 sacchetti.

Sacchetto 1 (materiale da conservare a $-20^{\circ}\text{C} \pm 6$):

- 10 vials numerate (da 1 a 10) contenenti un dischetto di *Salmonella* Typhimurium o *Salmonella* Enteritidis o un dischetto non contenente alcun microrganismo (bianco);
- 8 vials di controllo contenenti un dischetto con o senza *Salmonella* (numerazione da C1 a C8).

Sacchetto 2 (materiale da conservare tra $+2^{\circ}\text{C}$ e $+8^{\circ}\text{C}$):

- 10 sacchetti siglati da 1 a 10 contenenti ciascuno un paio di sovrascarpe addizionate con 5 grammi di feci bovine non contaminate con *Salmonella*;
- 9 sacchetti, siglati da C1 a C8 e C10, contenenti un paio di sovrascarpe;
- 1 sacchetto siglato C9 contenente un paio di sovrascarpe addizionate con 5 grammi di feci bovine non contaminate con *Salmonella*.

Lo studio verrà effettuato contemporaneamente da tutti i laboratori coinvolti .

I documenti necessari per partecipare allo studio sono i seguenti:

- Protocollo del Circuito Interlaboratorio per l'Isolamento di *Salmonella* spp.
- Procedura operativa (PO) del Circuito Interlaboratorio per l'Isolamento di *Salmonella* spp.
- Test Report del Circuito Interlaboratorio per l'Isolamento di *Salmonella* spp.
- Calendario delle attività

Tutti gli esiti (risultati) dovranno essere riportati nel Test Report e trasmessi secondo il calendario previsto al CRNS che effettuerà le analisi statistiche e provvederà a preparare un report relativo all'elaborazione dei risultati ottenuti; i risultati verranno inoltre trasmessi nel rispetto della privacy a ciascun laboratorio partecipante.

I terreni necessari ai fini dello studio NON verranno forniti dal Centro di Referenza

ALLEGATO 2

PROCEDURA OPERATIVA (PO)

CIRCUITO INTERLABORATORIO VI (2013)

ISOLAMENTO DI SALMONELLA SPP.

Organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi

1. Scopo e campo di applicazione

Questa Procedura Operativa (PO) descrive il protocollo per l'identificazione di *Salmonella* limitatamente all'effettuazione del presente Circuito Interlaboratorio. Per gli scopi previsti dallo studio si è scelto di utilizzare materiale di riferimento certificato contenente diverse concentrazioni di *Salmonella* Typhimurium (STM) e *Salmonella* Enteritidis (SE). Inoltre si è deciso di utilizzare come matrice sovrascarpe addizionate di feci di bovino non contaminate da *Salmonella*.

Le sovrascarpe rappresentano il metodo preferenziale per la collezione dei campioni di materiale fecale nell'ambito dei piani di controllo *Salmonella* attualmente in vigore.

2. Riferimenti bibliografici e normativi

- ✓ ISO 6579: 2002/ Cor1:2004/E "Microbiology of food and animal feeding stuffs– Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp."
- ✓ ISO 6579:2002/Amd 1 2007. Amendment 1 Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage
- ✓ Regolamento (CE) N°2160/2003 sul controllo della salmonella e altri agenti zoonotici specifici e successive regolamenti

3. Definizioni

Ai fini della presente PO si danno le seguenti definizioni:

- *Salmonella*: microrganismo che forma colonie più o meno tipiche in terreni solidi selettivi e che manifesta determinate caratteristiche sierologiche e biochimiche
- *Identificazione di Salmonella*: determinazione della presenza/assenza di *Salmonella* a partire da materiale di riferimento in accordo con quanto previsto dalla presente PO.
- *Materiale di Riferimento*: dischetti contenenti una specifica quantità di un ceppo di riferimento.

4. Principio del metodo

L'identificazione di Salmonella prevede le seguenti fasi:

- a) Pre-arricchimento
- b) Arricchimento selettivo
- c) Isolamento
- d) Conferma di colonie caratteristiche

5. *Lista degli acronimi utilizzati*

PO Procedura Operativa

RM Materiale di Riferimento

CRNS Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi

6. *Terreni/Soluzioni/Reagenti*

Per questo studio è previsto l'utilizzo dei seguenti terreni/soluzioni/ reagenti :

- APTS (Acqua Peptonata Tamponata Salmonella)
- MSR.V (Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis medium)
- XLD Xylose Lysine Deoxycholate Agar (obbligatorio) + un secondo terreno di isolamento selettivo a scelta (obbligatorio)
- NA (Nutrient Agar)
- TSIA (Triple Sugar Iron Agar)
- UA (Urea Agar)
- Lisina (l-Lysine Decarboxylation medium)
- TTM (Tryptone -Tryptophan medium)
- ONPG (Orto-Nitril-Fenil-Galattosidasi)
- VP (Voger Proskauer medium)
- Reattivi VP1-VP2
- Soluzione di Creatina
- Reattivo di Kovacs

La descrizione delle caratteristiche dei terreni e dei reagenti e le modalità di preparazione sono descritte nel documento ISO 6579:2002/Amd 1 2007 .

Oltre al metodo prescritto è possibile utilizzare altri metodi, ad esempio quello comunemente utilizzato presso il laboratorio, avendo cura di riportare le informazioni richieste sul Test Report.

6.1 Terreno di pre-arricchimento non selettivo

- APTS

6.2 Terreno di arricchimento selettivo

- MSR.V
- Terreno di arricchimento selettivo comunemente utilizzato presso il laboratorio (**facoltativo**)

6.3 Terreni di isolamento selettivo differenziale

- XLD
- Secondo terreno di isolamento selettivo comunemente utilizzato presso il laboratorio (**obbligatorio**)

6.4 Conferma isolamento

- NA
- **Prove Biochimiche**

L'identificazione biochimica può essere eseguita utilizzando le seguenti prove in macrometodo

- TSI
- UA
- Lisina
- TTM (reazione indolo con reattivo di Kovacs)
- ONPG
- VP (VP1-VP2 e soluzione di Creatina)

In alternativa è possibile utilizzare Kit commerciali di identificazione biochimica

7. *Procedura*

7.1 Indicazioni di carattere generale

Di seguito viene descritto in modo dettagliato il protocollo previsto nel presente studio. Si ricorda di registrare tutti i dati come richiesto nel Test Report.

7.2 Pre-riscaldamento dell'APTS (giorno 0)

Questa fase deve essere eseguita in accordo a quanto viene fatto di routine dal laboratorio; nel test report si deve avere cura di registrare le informazioni richieste.

7.3 Pre-arricchimento (giorno 1)

Porre a temperatura ambiente per circa 15 minuti il seguente materiale:

- vials contenenti i dischetti (numerate da 1 a 10 per i campioni e da C1 a C8 per i controlli),
- sacchetti con sovrascarpe addizionate con le feci (sacchetto siglato C9 e sacchetti numerati da 1 a 10)
- sacchetti di sovrascarpe non addizionate con le feci (numerati da C1 a C8 e C10)

Siglare venti contenitori in accordo con quanto descritto sopra (da C1 a C10 e da 1 a 10) e porre in ciascuno 225 ml di APTS pre- riscaldato; aggiungere quindi i dischetti delle corrispondenti vials (numerati da 1 a 10, campioni, e da C1 a C8, controlli).

Lasciare dissolvere i dischetti per 30 minuti a temperatura ambiente e agitare manualmente.

Infine prelevare le sovrascarpe, con o senza feci, da ciascun sacchetto fornito dal CNRS e riporle nel corrispondente contenitore. Agitare manualmente.

Prima di procedere assicurarsi che la matrice sovrascarpe (con le feci) sia completamente immersa nell'APTS.

! I dischetti sono di dimensione estremamente ridotte e di colore rosa.

! Il sacchetto siglato C9 corrisponde ad un sacchetto contenente sovrascarpe con feci al quale verrà aggiunto esclusivamente APTS non contaminato.

! Il sacchetto siglato C10 corrisponde ad un sacchetto contenente solo sovrascarpe al quale verrà aggiunto esclusivamente APTS non contaminato.

Porre tutti i contenitori in termostato a 37 ± 1 °C per 18 ± 2 h. Registrare la temperatura ed il tempo all'inizio e alla fine del periodo di incubazione previsto e riportare le informazioni nel Test Report.

7.4 Arricchimento selettivo (giorno 2)

Lasciare le piastre di MSR/V a temperatura ambiente qualora fossero state conservate a temperatura di refrigerazione. Asciugare, se necessario, la superficie delle piastre sotto cappa a flusso laminare. Registrare i dati relativi alle piastre di MSR/V nell'apposito spazio del Test Report.

Sigare 10 piastre di MSR/V da 1 a 10 e 10 piastre da C1 a C10.

Inoculare le piastre di MSR/V ponendo 3 gocce di brodocoltura di APTS, per un totale di circa 0.1 ml, ai vertici di un triangolo equilatero sulla superficie della piastra.

Porre le piastre in termostato a $41,5 \pm 1$ °C per 24 ± 3 h facendo attenzione a non capovolgerle. Se dopo le prime 24 ± 3 h di incubazione le piastre risultano negative o dubbie re-incubarle per ulteriori 24 ± 3 h.

Registrare la temperatura ed il tempo all'inizio e alla fine del periodo di incubazione così come richiesto dal Test Report.

Qualora venga utilizzato un terreno di arricchimento selettivo opzionale avere cura di segnalarlo nell'apposito spazio del Test Report e riportare le informazioni richieste.

Registrare la temperatura ed il tempo all'inizio e alla fine del periodo di incubazione così come richiesto dal Test Report.

7.5 Terreni di isolamento (primo e secondo isolamento; giorni 3 e 4)

Riportare nel Test Report i dati richiesti relativamente ai terreni utilizzati.

Primo isolamento dopo 24 h

Seminare, nei terreni di isolamento selettivo, a partire da ciascuna piastra di MSR/V sospetta positiva ed eventualmente da ciascun terreno di arricchimento selettivo opzionale.

Devono essere utilizzati i seguenti terreni di isolamento:

1) Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD)

Porre le piastre in termostato a 37 ± 1 °C, avendo cura di riportare nell'apposito spazio del Test Report ora e temperatura all'inizio e alla fine del periodo di incubazione.

2) Terreno a scelta

Seminare e incubare il terreno utilizzato secondo le condizioni stabilite avendo cura di riportare nell'apposito spazio del Test Report ora e temperatura all'inizio e alla fine del periodo di incubazione.

Dopo 24 ± 3 h di incubazione esaminare le piastre ed identificare l'eventuale presenza di colonie riferibili a *Salmonella* spp.

Qualora venga utilizzato un ulteriore (opzionale) terreno di isolamento selettivo avere cura di segnalarlo nell'apposito spazio del Test Report e di riportare le informazioni richieste.

Secondo isolamento dopo 48 h

Dopo ulteriori 24 ± 3 h di incubazione delle piastre di MSR/V risultate negative o dubbie al termine della prima incubazione ripetere, per le piastre positive o sospette, quanto descritto al paragrafo precedente relativamente al primo isolamento.

7.6 Conferma delle colonie dal primo e secondo isolamento (giorni 4 e 5)

Per la conferma (prove biochimiche) prendere in considerazione per ciascuna piastra sospetta e per ciascun terreno di isolamento utilizzato, almeno una colonia considerata caratteristica o comunque sospetta. Selezionare solo colonie ben isolate fino ad un massimo di 5 colonie per piastra. Conservare le piastre con il terreno di isolamento tra $+2^{\circ}\text{C}$ e $+8^{\circ}\text{C}$.

Prima delle prove biochimiche, nel caso in cui nei terreni selettivi differenziali non siano presenti colonie sospette ben isolate, eseguire una subcultura in una piastra di Nutrient Agar (NA) opportunamente siglata in modo tale da consentire la crescita di colonie ben isolate.

Riportare nel Test Report i dati richiesti relativamente al NA. Porre in termostato le piastre a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 3 h.

Prove biochimiche

Per le prove biochimiche in macrometodo si ritengono obbligatorie TSI, UA, LISINA, TTM, ONPG, VP, secondo quanto descritto nella ISO 6579 Annex B.6-B.11, opzionali altre prove aggiuntive utilizzate in laboratorio.

È inoltre possibile utilizzare in alternativa, o ulteriormente alle prove biochimiche in macrometodo, kit di identificazione commerciali avendo cura di riportare le informazioni richieste nel Test Report.

Inoculare i terreni di seguito specificati selezionando una colonia caratteristica direttamente dal terreno selettivo o dal NA. Per ciascuno dei terreni descritti seguire le indicazioni riportate di seguito.

Se si ritiene opportuno è possibile effettuare ulteriori prove di identificazione biochimica riportando nel Test Report i dati richiesti.

- **TSI**
- **UA**
- **Lisina Decarbossilasi**
- **TTM**
- **ONPG**
- **VP**

Se la colonia inizialmente selezionata non viene confermata è possibile selezionare fino ad un massimo di ulteriori 4 colonie caratteristiche dallo stesso terreno di isolamento conservato a temperatura di refrigerazione. Riportare il numero di colonie testate ed il numero di colonie confermate come salmonella per ciascuna piastra nel Test Report.

8. Test Report

Nel Test Report verranno riportate tutte le informazioni che possono aver influenzato i risultati oltre che informazioni relative a procedure comunemente utilizzate presso il laboratorio ma non incluse nella presente.

ALLEGATO 3

TEST REPORT

CIRCUITO INTERLABORATORIO IV (2011)

ISOLAMENTO DI SALMONELLA SPP.

Organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi

Laboratorio	
Data di arrivo del materiale - - 2011
Data inizio stoccaggio materiale di riferimento - 20 °C	Data:..... Ora:.....
Data inizio stoccaggio feci a + 4 °C	Data:..... Ora:.....
Data inizio test - - 2011

PRE-ARRICCHIMENTO – Acqua Peptonata Tamponata Salmonella (APTS)

APTS	
Data di preparazione - - 2011
N° di lotto

Pre-riscaldamento di APTS: tempo e temperatura	
Inizio	Data: - - 2011 tempo: h min Temperatura termostato: °C
Fine	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C

Incubazione APTS:tempo e temperatura	
Inizio	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C
Fine	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C

ARRICCHIMENTO SELETTIVO Modified Semi solid Rappaport Vassiliadis medium(MSRV)

MSRV	
Data di preparazione - - 2011
N° di lotto

Tempo e temperatura di incubazione del terreno di arricchimento MSRV	
Inizio primo pre-arricchimento (24 ore)	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C
Fine primo pre-arricchimento (24 ore)	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C
Inizio successivo pre-arricchimento (secondo 24 ore)	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C
Fine successivo pre-arricchimento (secondo 24 ore)	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C

PRIMO E SECONDO ISOLAMENTO- XLD

XLD	
Data di preparazione - - 2011
N° di lotto

Tempo e temperatura di incubazione	
Inizio incubazione XLD, da MSR V 24 h	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C
Fine incubazione XLD, da MSR V 24 h	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C
Inizio incubazione XLD, da MSR V 48 h	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C
Fine incubazione XLD, da MSR V 48 h	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C

**PRIMO E SECONDO ISOLAMENTO – SECONDO TERRENO SELETTIVO
DIFFERENZIALE**

Nome del terreno:	
Data di preparazione - - 2011
N° di lotto

Tempo e temperatura di incubazione	
Inizio incubazione da MSRV 24 h	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C
Fine incubazione da MSRV 24 h	Data: - - 2011 tempo: h min Temperatura termostato: °C
Inizio incubazione da MSRV 48 h	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C
Fine incubazione da MSRV 48 h	Data: - - 2011 tempo: h min temperatura termostato: °C

CONFERMA– Agar triptosio

AT	
Data di preparazione - - 2011
N° di lotto

PROVE BIOCHIMICHE

Informazioni relativamente a TSI agar	
Data preparazione	
N° di lotto	

Informazioni relativamente a urea agar	
Data preparazione	
N° di lotto	

Informazioni relativamente a lisina decarbossilasi	
Data preparazione	
N° di lotto	

Informazioni relativamente a ulteriore prova di conferma biochimica (opzionale)	
Tipo di prova:	
Data preparazione	
N° di lotto	

Informazioni relativamente a ulteriore prova di conferma biochimica (opzionale)	
Tipo di prova:	
Data preparazione	
N° di lotto	

Informazioni relativamente a ulteriore prova di conferma biochimica (opzionale)	
Tipo di prova:	
Data preparazione	
N° di lotto	

Informazioni relativamente a Kit commerciale di identificazione biochimica	
.....	
Nome commerciale	
Numero lotto	
Data scadenza	

Tabella 1a: Risultati dell'isolamento utilizzando MSRV (campioni numerati 1-12)

Campione n°.	MSRV 24 ore						MSRV 48 ore					
	XLD		Secondo terreno di isolamento (obbligatorio)		Ulteriore terreno di isolamento (opzionale)		XLD		Secondo terreno di isolamento (obbligatorio)		Ulteriore terreno di isolamento (opzionale)	
	Col ^a	Sal ^b	Col	Sal	Col	Sal	Col	Sal	Col	Sal	Col	Sal
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												

a: Col = numero di colonie usate per la conferma, b: Sal = numero di colonie confermate Salmonella

Tabella 1b: Risultati dell'isolamento utilizzando MSR/V (campioni numerati C1-C10)

Campiono n°.	MSRV 24 ore						MSRV 48 ore					
	XLD		Secondo terreno di isolamento (obbligatorio)		Ulteriore terreno di isolamento (opzionale)		XLD		Secondo terreno di isolamento (obbligatorio)		Ulteriore terreno di isolamento (opzionale)	
	Col ^a	Sal ^b	Col	Sal	Col	Sal	Col	Sal	Col	Sal	Col	Sal
C1												
C2												
C3												
C4												
C5												
C6												
C7												
C8												
C9												
C10												

a: Col = numero di colonie usate per la conferma, b: Sal = numero di colonie confermate Salmonella

Tabella 2 a: Risultati ottenuti utilizzando metodica aggiuntiva in uso presso il laboratorio (campioni numerati 1-12)

Campiono no.	Incubazione pre-arricchimento 24 ore						Incubazione pre-arricchimento 48 ore					
	Primo terreno selettivo		Secondo terreno selettivo		Ulteriore terreno		Primo terreno selettivo		Secondo terreno selettivo		Ulteriore terreno	
	Col ^a	Sal ^b	Col	Sal	Col	Sal	Col	Sal	Col	Sal	Col	Sal
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												

a: Col = numero di colonie usate per la conferma, b: Sal = numero di colonie confermate Salmonella

Tabella 2b: Risultati dell'isolamento utilizzando MSRV (campioni numerati C1-C10)

Campioni no.	Incubazione pre-arricchimento 24 ore						Incubazione pre-arricchimento 48 ore					
	Primo terreno selettivo		Secondo terreno selettivo		Ulteriore terreno		Primo terreno selettivo		Secondo terreno selettivo		Ulteriore terreno	
	Col ^a	Sal ^b	Col	Sal	Col	Sal	Col	Sal	Col	Sal	Col	Sal
C1												
C2												
C3												
C4												
C5												
C6												
C7												
C8												
C9												
C10												

a: Col = numero di colonie usate per la conferma, b: Sal = numero di colonie confermate Salmonella

Commenti relativi al metodo utilizzato che si ritiene possano aver influenzato il test:

Nome del personale che hanno effettuato il test	
Data e firma	

Nome del responsabile del laboratorio	
Data e firma	

Si prega di trasmettere il Test Report entro la data prevista via e-mail al Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi

IZS Venezia, CRN-Salmonella
 Viale dell'Università 10
 35020 Legnaro (PD)

Tel.: 049 8084283
 Fax: 049 8830268
 Email: vcibin@izsvenezie.it
csaccardin@izsvenezie.it