

*Anno 2011*

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

---

**IV Circuito Interlaboratorio nazionale:  
isolamento *Salmonella* spp. da campioni  
di origine veterinaria\_produzione  
primaria**

***ANNO 2011***

## **1. Introduzione**

Uno dei principali compiti dei Centri di Referenza Comunitari e Nazionali, come stabilito anche con Regolamento CE 882/2004, è quello di organizzare circuiti interlaboratorio al fine di valutare la performance dei laboratori presenti nel territorio di competenza. Per quanto riguarda l'isolamento di *Salmonella* spp. in campioni di origine animale, la necessità di garantire elevati standard qualitativi diviene un requisito fondamentale secondo le prescrizioni del Regolamento CE 2160/2003 e dei successivi emendamenti, che prevedono l'attuazione di piani nazionali di controllo finalizzati a ridurre la prevalenza di sierotipi rilevanti di *Salmonella* spp. in determinate specie produttive. I laboratori che eseguono le analisi nell'ambito dei piani di controllo devono garantire elevati ed equivalenti standard qualitativi. L'attuazione periodica di circuiti interlaboratorio permette di valutare la qualità dei dati forniti dai laboratori e di assicurare la conformità delle analisi da questi eseguite.

La metodica di riferimento impiegata nel presente circuito di isolamento di *Salmonella* spp. è l'Annex D (2007) della ISO 6579:2002. Tale metodica, finalizzata all'identificazione di *Salmonella* spp. in campioni prelevati a livello di produzione primaria, differisce dalla ISO esclusivamente per il tipo di terreno di arricchimento selettivo utilizzato. Mentre nella ISO 6579:2002 viene prescritto l'utilizzo di due brodi (MKTTn e RVB), l'Annex D prevede l'esclusivo impiego di un terreno semisolido, il Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis (MSRV); l'applicazione di tale metodica è obbligatoriamente prevista nell'ambito dell'attuazione dei piani di monitoraggio e controllo di *Salmonella* spp. a livello di produzione primaria.

Questo circuito di isolamento di *Salmonella* spp. da campioni di origine animale rappresenta il quarto organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi (CRNS) in tale ambito.

La modalità di organizzazione e la tipologia di campioni esaminati riproducono fedelmente quanto realizzato nell'ambito del terzo circuito.

## **2. Laboratori Partecipanti**

Al presente circuito hanno preso parte 27 laboratori, di cui 25 afferenti agli istituti zooprofilattici e 2 privati. Di seguito viene riportata la lista dei laboratori partecipanti. Ciascun laboratorio, nell'ambito del circuito, è stato identificato con un codice numerico assegnato arbitrariamente.

<b>ISTITUTO</b>	<b>Referente</b>
Istituto Zooprofilattico della Sardegna – Sassari - Laboratorio di Batteriologia	Dott. Stefano Lollai
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle regioni Lazio e Toscana – Roma – Struttura Diagnostica Generale	Dott.ssa Alessia Franco
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d’Aosta – Torino – Laboratorio di Patologia Animale e Stabulario	Dott.ssa Carla Grattarola
Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise “G. Caporale” – Teramo – Reparto di Microbiologia Diagnostica	Dott. Andrea Di Provvido /Massimo Scacchia
Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche – Perugia – Laboratorio di Diagnostica	Dott.ssa Chiara Magistrali
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna – Sezione Diagnostica di Brescia	Dott.ssa Mariagrazia Zanoni
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno – Portici (NA) – UOS di Diagnostica	Dott.ssa Anna Cerrone
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno – Salerno – Sezione Diagnostica	Dott.ssa Esterina De Carlo
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno – Catanzaro – Sezione Diagnostica	Dott.ssa Caterina Rivero
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e Basilicata – Foggia – Laboratorio di Diagnostica Generale	Dott. Pasquale Troiano
Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata – Potenza – Sezione Diagnostica	Dott.ssa Lucia Palazzo
Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata – Brindisi	Dott. Lorenzo De Bellis
Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata – Taranto	Dott.ssa Laura Guarino
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Palermo – Sezione Diagnostica	Dott. Domenico Vicari
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Ragusa	Dott. Giovanni Tumino
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia – Catania	Dott.ssa Annamaria Marino
<b>ISTITUTO Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie</b>	<b>Referente</b>
Sezione Diagnostica di Bolzano	Dott.ssa Trevisiol
Sezione Diagnostica di Padova	Dott. Iob
Sezione Diagnostica di Pordenone	Dott. ssa Conedera
Sezione Diagnostica di San Donà di Piave	Dott. Cereser
Sezione Diagnostica di Trento	Dott. Farina
Sezione Diagnostica di Treviso	Dott. Agnoletti
Sezione Diagnostica di Udine	Dott. Bregoli

Sezione Diagnostica di Vicenza	Dott. Barberio
Sezione Diagnostica di Verona	Dott. Vincenzoni
Laboratorio privato 1	Dott.ssa Cerruti
Laboratorio privato 2	Dott. Sperati

**Tabella 1** Elenco dei Laboratori partecipanti al Circuito

### 3. Materiali

#### *Materiale di riferimento*

Per l'esecuzione del circuito è stato utilizzato materiale di riferimento certificato, fornito dalla Health Protection Agency (UK).

Il CRNS ha provveduto ad acquistare anticipatamente il quantitativo di materiale di riferimento necessario per l'esecuzione del circuito. Il materiale di riferimento utilizzato è rappresentato da dischetti (lenticules) contenenti diverse concentrazioni di *Salmonella* spp. Nello specifico sono state impiegate lenticules “bianchi” non contenenti alcun microrganismo, lenticules contenenti rispettivamente 150 e 50 ufc (unità formanti colonia) di *Salmonella* Enteritidis (SE) e lenticules di *Salmonella* Typhimurium (STM) pari a 6 e 61 ufc.

Una volta ricevuto il materiale di riferimento dalla ditta produttrice si è provveduto a conservarlo a  $-20 \pm 5$  °C, temperatura che permette di garantirne la stabilità 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 implichi un'alterazione delle caratteristiche.

I dischetti di riferimento sono stati forniti con documentazione atta a certificare la contaminazione media di ciascun lotto. Il livello medio di contaminazione dichiarato dalla ditta produttrice è stato calcolato valutando la contaminazione di 30 dischetti per lotto. Al fine di confermare il livello di contaminazione certificato dalla ditta produttrice il CRNS ha verificato la concentrazione di almeno tre dischetti per ciascun lotto, confermando i livelli di contaminazione indicati dalla ditta produttrice.

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 12 i dischetti da utilizzare per allestire i campioni artificialmente contaminati, e con numeri progressivi da C1 a C8 i dischetti da impiegare per allestire i controlli).

Ad ogni laboratorio è stato inviato il seguente materiale di riferimento:

- 3 dischetti contenenti 150 ufc (unità formanti colonia) di *S. Enteritidis* (2 da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp. e 1 da analizzare tal quale);
- 4 dischetti contenenti 50 ufc di *S. Enteritidis* (1 da aggiungere al campione di feci di origine animale negativo per *Salmonella* spp. e 3 da analizzare tal quali);
- 6 dischetti contenenti 6 ufc di *S. Typhimurium* (4 da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp. e 2 da analizzare tal quali);
- 3 dischetti contenenti 61 ufc di *S. Typhimurium* (2 da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp. e 1 da analizzare tal quale);
- 4 dischetti “bianchi” non contenenti *Salmonella* spp. (3 da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp. e 1 da analizzare tal quale).

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

#### ***Feci di origine animale negative per Salmonella spp.***

Ai laboratori partecipanti sono state inviate aliquote di circa 220 g di feci di pollo negative per *Salmonella* spp.

Prima di inviare tale materiale ai laboratori partecipanti, al fine di assicurare la negatività per *Salmonella* spp. delle feci prelevate, si è proceduto suddividendo le feci in un numero di aliquote pari al numero dei partecipanti. Quindi, da ciascuna aliquota, sono stati prelevati 25 g di campione e si è proceduto alla ricerca di *Salmonella* spp. secondo la metodica definita nell'Annex D della ISO 6579:2002. Tutte le analisi eseguite hanno permesso di verificare la negatività delle feci per *Salmonella*.

Inoltre, sul materiale fecale sono stati eseguiti due controlli, relativi alla determinazione della carica Mesofila Totale (procedura ISO 4833:2003) e degli Enterobatteri (procedura ISO 21528-2:2004), uno al momento dell'arrivo delle feci al CRNS e l'altro prima dell'invio del materiale ai laboratori partecipanti al circuito. I risultati sono riportati in tabella 2.

Le aliquote di feci destinate ai singoli partecipanti sono state conservate in sacchetti sigillati, mantenuti a temperatura di congelamento ( $-20^{\circ}\text{C} \pm 5$ ), fino al momento della spedizione.

Data	Carica mesofila totale (ufc/g)	Enterobatteriaceae (ufc/g)
16-08-2011	$1.4 * 10^8$	$7.5 * 10^3$
15-09-2011	$1 * 10^{10}$	$1.5 * 10^3$

**Tabella 2** Carica mesofila ed Enterobatteriaceae per grammo di feci di pollo

### **Calendario delle attività**

Le attività pianificate nell'ambito del circuito sono state svolte secondo la tempistica definita nel calendario inviato anticipatamente ai partecipanti. Tale calendario è stato trasmesso ai laboratori dal CRNS nella seconda metà del mese di Agosto 2011, mentre il materiale per lo svolgimento della prova è stato inviato in data 20 Settembre 2011 e lo studio è stato effettuato nella prima settimana di Ottobre.

### **Documenti trasmessi ai laboratori partecipanti**

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

- alla tipologia di materiale consegnato e alle modalità di conservazione - Protocollo del Circuito Interlaboratorio per l'Isolamento di *Salmonella* spp (Allegato 1);
- alla modalità di preparazione dei campioni e alla procedura da utilizzare per l'esecuzione della prova - Procedura operativa (PO) del Circuito Interlaboratorio per l'Isolamento di *Salmonella* spp. (Allegato 2);
- al test report in cui riportare le informazioni relative alla prova e i risultati ottenuti (Allegato 3).

### **Procedura operativa (Allegato 2)**

8 lenticules "controllo" testate senza aggiunta di feci numerate da C1 a C8;

1 campione di APTS (Acqua Peptonata Tamponata) numerato C9;

1 campione di APTS addizionato con 25 g di feci, numerato C10;

12 lenticules numerate da 1 a 12 testate in combinazione con 10 g di feci (negative per *Salmonella* spp.).

La tipologia e il numero di capsule da testare senza e con l'aggiunta di feci sono riportate in tabella 3.

Lenticules	Lenticules controllo (n=8) senza aggiunta feci	Lenticules (n=12) con aggiunta di 10 g di feci negative per <i>Salmonella</i>
S. Enteritidis 50 (SE 50)	3	1
S. Enteritidis 150 (SE 150)	1	2
S. Typhimurium 6 (STM 6)	2	4
S. Typhimurium 61 (STM 61)	1	2
Bianco	1	3

**Tabella 3** Tipo e numero di lenticules testate

#### 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.

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

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

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

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 definiti dal CRNS per la definizione delle buone performance dei laboratori partecipanti al circuito.

	Risultati minimi	
CONTROLLI	% positivi	N° campioni positivi/ N° totale di campioni
SE (SE 50 ufc + SE 150 ufc)	75%	3/4
STM (STM 6 ufc + STM 61 ufc)	100%	3/3
Bianchi	0%	0/2*
CAMPIONI	% positivi	N° campioni positivi/ N° totale di campioni
SE (SE 50 ufc + SE 150 ufc)	33%	1/3
STM (STM 6 ufc + STM 61 ufc)	83%	5/6
Bianchi	33%	1/3**

**Tabella 4:** Criteri di conformità

\*sono stati considerati sia il controllo rappresentato dalla capsula “bianco” che il controllo 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.

Per quanto riguarda i terreni selettivi-differenziali, come previsto dalla procedura, tutti i partecipanti hanno utilizzato l'XLD. Il BGA è stato utilizzato come secondo terreno selettivo differenziale da 12 laboratori, il Rambach da 5 laboratori, il Brilliance Salmonella Agar da 3 laboratori, il Salmonella-Shigella Agar da 2 laboratori ed infine 1 laboratorio ha impiegato un terreno cromogeno.

Per le prove biochimiche 9 laboratori hanno utilizzato esclusivamente un kit commerciale, mentre i rimanenti laboratori hanno impiegato diverse prove biochimiche in parallelo o meno a kit di conferma biochimica commerciali.

Codice del laboratorio	Terreno di arricchimento selettivo	Terreno di arricchimento selettivo-differenziale	Prove di conferma biochimica
1	MSRV	XLD, BGA	API 20 E; Card Vitek 2 GN
2	MSRV	XLD, BGA	TSI, Microbact 12/A (Oxoid)
3, 4, 5, 7, 11	MSRV	XLD, BGA	API 20 E
6	MSRV	XLD, BGA	TSI, API 20 E
8	MSRV	XLD, BGA	TSI, Urea Agar, Lisina Decarbossilasi, ONPG; SIM
9	MSRV	XLD, BGA	TSI, Urea Agar, Lisina Decarbossilasi, VP; TTM; ONPG; API 20 E
10	MSRV	XLD, BGA	TSI, Urea Agar, Lisina Decarbossilasi, Salmonella Latex Test; Bactident Oxidase; API 10 S; API 20 E
12	MSRV	XLD BSA (Brilliance Salmonella Agar)	VITEK 2 Systems - GN Card
13	MSRV	XLD BSA (Brilliance Salmonella Agar)	Kit commerciale BIOLOG
14	MSRV	XLD BGA	TSI; Anti siero Salmonella poliagglutinante "Asino D"; Sieroagglutinante poli H; Enterotube
15	MSRV	XLD BGA	TSI; Urea agar; Lisina Decarbossilasi; Indolo; VP medium; B-galattosidasi; Difco™ Salmonella O
16	MSRV	XLD BGA	TSI API 20 E
17	MSRV	XLD BGA	TSI Agglutinazione con antisiero Poly A. I e Vi API 20 E
18	MSRV	XLD BGA	TSI API 20 E

Codice del laboratorio	Terreno di arricchimento selettivo	Terreno di arricchimento selettivo-differenziale	Prove di conferma biochimica
19	MSRV	XLD Salmonella-Shigella agar	TSI Ossidasi API 20 E
20	MSRV	XLD Terreno cromogenico per Salmonella (Biorad)	TSI Urea Agar Lisina Decarbossilasi
21	MSRV	XLD Rambach Agar	TSI; Urea brodo; Salmonella Test Serum; API 20 E
22	MSRV	XLD SS Agar	TSI Urea Agar Lisina Decarbossilasi
23	MSRV	XLD Rambach Agar	TSI Urea agar Lisina Decarbossilasi
24	MSRV	XLD Rambach Agar	TSI Ossidasi Siero Poly A - S e Vi API 20 E
25	MSRV	XLD Rambach Agar	TSI Ossidasi API 20 E
26	MSRV	XLD Rambach Agar	TSI API 20 E
27	MSRV	XLD BSA	GN 20 Card

**Tabella 5** Terreni di arricchimento selettivo, terreni di arricchimento selettivi-differenziali e prove di conferma biochimica utilizzati dai singoli laboratori partecipanti

Di seguito (tabella 6) vengono riportate le principali deviazioni rispetto all'Annex D ISO 6579:2002, riscontrate nei test report compilati da parte dei laboratori partecipanti.

Codice laboratorio	Prearricchimento (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)
<b>Annex D ISO 6579:2002</b>	<b>16-20</b>	<b>36-38</b>	<b>2 X (24 ± 3) h</b>	<b>40.5 – 42.5</b>
3	22:15	36.8-37.1	47:15	41.5-41.7
5	21:40	37.2	48:25	41.0-41.1
9	21:00	37.1-37.2	47:45	36.5-37.1
17	22:00	37.0	48:00	42.0
18	19:00	36.3-36.5	46:10	40.1-40.2
20	20:30	36.0-37.0	47:30	42.6
27	21:40	37.2	45:45	39.5-42.1

**Tabella 6** Tempi e temperature d'incubazione delle fasi di prearricchimento e arricchimento selettivo  
Celle grigie: tempi e temperature che si discostano dall'Annex D

6 laboratori (codice identificativo 3, 5, 9, 17, 20, 27) hanno prolungato il prearricchimento in APTS oltre la tempistica prevista dall'Annex D. Di questi 6 laboratori, 3 (codice identificativo 9, 20, 27) non hanno rispettato il range di temperatura di incubazione dell'MSRV, lo stesso problema è stato evidenziato anche per un quarto laboratorio (codice identificativo 18). Nello specifico nella fase di incubazione del terreno selettivo i laboratori sopra indicati hanno riportato temperature inferiori o superiori rispetto al range (40,5 – 42,5 °C) previsto dalla procedura. Il laboratorio 9 ha riportato per tutta la fase di arricchimento selettivo dell'MSRV temperature di incubazione di 3 gradi inferiori rispetto a quanto previsto dalla procedura.

#### *Risultati campioni controllo (C9-C10)*

Un laboratorio su ventisette (codice identificativo 9) ha identificato come positivo il controllo 9 (90 ml di APTS analizzato senza aggiunta né di un dischetto di materiale di riferimento, né delle feci).

#### *Campione di controllo "bianco"*

Il campione di controllo contaminato con dischetto bianco (non contenente *Salmonella* spp.) è stato identificato come negativo da tutti i ventisette laboratori partecipanti.

#### *Campioni di controllo Salmonella Enteritidis 50 ufc (3)*

Tutti i laboratori partecipanti hanno fornito esito positivo per i tre campioni di controllo contaminati con SE 50 ufc.

#### *Campioni di controllo Salmonella Enteritidis 150 ufc (1)*

Il campione di controllo contaminato con dischetto di SE 150 ufc è stato identificato come positivo da tutti i ventisette laboratori partecipanti.

#### *Campioni di controllo Salmonella Typhimurium 6 ufc (2)*

Tutti i ventisette laboratori partecipanti hanno fornito esito positivo per i due campioni di controllo contaminati con STM 6 ufc.

#### *Campioni di controllo Salmonella Typhimurium 61 ufc (1)*

Tutti i ventisette laboratori partecipanti hanno fornito esito positivo per il campione di controllo contaminato con STM 61 ufc.

Di seguito (tabella 7) vengono sintetizzati i risultati prendendo in considerazione i campioni di controllo ed i diversi livelli di contaminazione.

<b>CAMPIONI DI CONTROLLO</b>		<b>MSRV</b>
<b>Dischetti “bianchi” (1 per lab) + controllo APTS</b>	N° di campioni	54
	Campioni negativi	53
	Specificità in %	98,15%
<b>SE 50 ufc/dischetto (3 per lab)</b>	N° di campioni	81
	Campioni positivi	81
	Sensibilità in %	100%
<b>SE 150 ufc/dischetto (1 per lab)</b>	N° di campioni	27
	Campioni positivi	27
	Sensibilità in %	100%
<b>STM 6 ufc/dischetto (2 per lab)</b>	N° di campioni	54
	Campioni positivi	54
	Sensibilità in %	100%
<b>STM 61 ufc/dischetto (1 per lab)</b>	N° di campioni	27
	Campioni positivi	27
	Sensibilità in %	100%
<b>Tutti i dischetti contaminati con Salmonella</b>	N° di campioni	189
	Campioni positivi	189
	Sensibilità in %	100%
<b>Tutti i controlli</b>	N° di campioni	243
	Campioni corretti	242
	Accuratezza in %	99,59%

**Tabella 7** Valori di specificità, sensibilità e accuratezza complessivi ottenuti valutando le performance ottenute dai laboratori partecipanti (27) sui campioni controllo esaminati senza l’aggiunta di feci negative per *Salmonella* spp.

Il valore percentuale di specificità ottenuto dai laboratori partecipanti è pari al 98,15%. La sensibilità dei controlli è risultata pari al 100% per i diversi livelli di contaminazione considerati (SE 50 ufc; SE 150 ufc; STM 6 ufc; STM 61 ufc). Ne consegue che la sensibilità complessiva, ottenuta per i campioni controllo contenenti *Salmonella* spp., è risultata pari al 100% e che l’accuratezza risulta pari a 99,59%.

### Campioni artificialmente contaminati

#### Dischetti bianchi (3)

I tre campioni contaminati con “dischetti bianchi” a cui sono state aggiunte le feci negative per *Salmonella* spp. sono stati identificati come negativi da 25 su 27 laboratori partecipanti. Due laboratori (codice identificativo 9 e 10) hanno identificato come negativi due campioni su tre.

Bianchi	Codici di laboratorio																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
MSRV	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

**Tabella 8** Numero di isolamenti di *Salmonella* spp. dei laboratori partecipanti relativi ai campioni di feci contaminati con dischetti “bianchi”

#### Dischetti *Salmonella Enteritidis* 50 ufc (1)

6 laboratori su 27 (codice identificativo 3, 6, 7, 16, 19, 21) non hanno isolato *Salmonella* spp. dal campione di feci contaminato con SE 50 ufc.

SE 50ufc	Codici di laboratorio																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
MSRV	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1

**Tabella 9** Numero di isolamenti di *Salmonella* spp. dei laboratori partecipanti relativi ai campioni contaminati con *S. Enteritidis* 50 ufc

#### Dischetti *Salmonella Enteritidis* 150 ufc (2)

25 laboratori hanno fornito esito positivo per i due campioni contaminati con SE 150 ufc, mentre due laboratori (codice identificativo 3 e 16) non hanno identificato come positivo nessuno dei due campioni contaminati con SE 150 ufc.

SE 150ufc	Codici di laboratorio																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
MSRV	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

**Tabella 10** Numero di isolamenti di *Salmonella* spp. dei laboratori partecipanti relativi ai campioni contaminati con *S. Enteritidis* 150 ufc

#### Dischetti *Salmonella Typhimurium* 6 ufc (4)

Tutti i 27 laboratori hanno fornito esito positivo per i quattro i campioni contaminati con STM 6 ufc.

#### Dischetti *Salmonella Typhimurium* 61 ufc(2)

Un laboratorio su 27 (codice identificativo 9) non ha identificato correttamente uno dei due campioni di feci a cui è stato aggiunto il dischetto contaminato con STM 61 ufc.

STM 61ufc	Codici di laboratorio																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
MSRV	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

**Tabella 11** Numero di isolamenti di *Salmonella* spp. dei laboratori partecipanti relativi ai campioni contaminati con *S.* Typhimurium 61 ufc

### Specificità, Sensibilità e Accuratezza

Di seguito vengono sintetizzati i risultati prendendo in considerazione i campioni di prova ed i diversi livelli di contaminazione.

CAMPIONI DI PROVA		MSRV
<b>Dischetti “bianchi” (3 per lab)</b>	N° di campioni	81
	Campioni negativi	79
	Specificità in %	97%
<b>SE 50 ufc/dischetto (1 per lab)</b>	N° di campioni	27
	Campioni positivi	21
	Sensibilità in %	78%
<b>SE 150 ufc/dischetto (2 per lab)</b>	N° di campioni	54
	Campioni positivi	50
	Sensibilità in %	92%
<b>STM 6 ufc/dischetto (4 per lab)</b>	N° di campioni	108
	Campioni positivi	108
	Sensibilità in %	100%
<b>STM 61 ufc/dischetto (2 per lab)</b>	N° di campioni	54
	Campioni positivi	53
	Sensibilità in %	98%
<b>Tutti i dischetti contaminati Salmonella con</b>	N° di campioni	243
	Campioni positivi	232
	Sensibilità in %	95%
<b>Tutti i dischetti</b>	N° di campioni	324
	Campioni corretti	311
	Accuratezza in %	96%

**Tabella 12** Valori di specificità, sensibilità e accuratezza complessivi ottenuti valutando le performance ottenute dei laboratori partecipanti (27) sui campioni artificialmente contaminati con feci negative per *Salmonella* spp.

In tabella 12 sono riportati i valori di sensibilità, specificità e accuratezza dei campioni contenuti dischetti positivi per *Salmonella* spp. artificialmente contaminati con feci negative.

Il valore percentuale di specificità ottenuto dai laboratori partecipanti è pari al 97%. Valutando singolarmente i diversi sierotipi e livelli di contaminazione si nota che sensibilità pari al 100% è stata ottenuta per i campioni di feci contaminati STM 6 ufc, mentre per i campioni contaminati con STM 61 ufc la sensibilità ottenuta risulta pari al 98%; invece per SE 50 ufc e SE 150 ufc la sensibilità è risultata rispettivamente pari al 78 e 92%. Complessivamente per tutti i campioni artificialmente contaminati è stato ottenuto un valore di sensibilità pari al 95%. Per quanto riguarda l'accuratezza è stato registrato un valore pari a 96%.

### Valutazione delle performance dei laboratori partecipanti

Per quanto riguarda la valutazione dei laboratori partecipanti, sono stati presi in considerazione due indicatori di conformità relativi rispettivamente a:

- **corretta applicazione del protocollo.** A tal proposito non è stato considerato il mancato rispetto dei range di incubazione previsto per il terreno MSR/V, in quanto probabilmente l'anomalia registrata da alcuni laboratori è riconducibile ad una problematica legata al termostato impiegato per incubare i campioni e non direttamente imputabile all'operato del laboratorio.
- **soddisfacimento dei criteri stabiliti per la definizione di "performance buona" suddividendo tra conformità ai criteri definiti per i controlli e conformità ai criteri definiti per i campioni.**

Il raggiungimento o meno delle conformità da parte di ciascun laboratorio partecipante viene riassunto in tabella 13.

Codice Laboratorio	Conformità al protocollo	Conformità ai criteri definiti per i controlli	Conformità ai criteri definiti per i campioni
1	SI	SI	SI
2	SI	SI	SI
3	NO	SI	NO
4	SI	SI	SI
5	NO	SI	SI
6	SI	SI	SI
7	SI	SI	SI
8	SI	SI	SI
9	NO	NO	SI
10	SI	SI	SI
11	SI	SI	SI
12	SI	SI	SI
13	SI	SI	SI
14	SI	SI	SI
15	SI	SI	SI
16	SI	SI	NO
17	NO	SI	SI
18	SI	SI	SI
19	SI	SI	SI
20	NO	SI	SI
21	SI	SI	SI
22	SI	SI	SI
23	SI	SI	SI
24	SI	SI	SI
25	SI	SI	SI



26	SI	SI	SI
27	NO	SI	SI

**Tabella 13** Criteri di conformità e risultati dei singoli laboratori partecipanti

Osservando la tabella si può notare come su 27 laboratori partecipanti 6 (codice identificativo 3, 5, 9, 17, 20, 27) non hanno applicato correttamente la procedura, 1 laboratorio (codice identificativo 9) non è risultato conforme ai criteri di accettabilità definiti per i controlli e 2 laboratori (codice identificativo 3 e 16) non sono risultati conformi ai criteri definiti per i campioni.

## 6. Conclusioni

- 24 su 27 laboratori hanno soddisfatto i criteri di “buona performance” definiti sia per i controlli che per i campioni, Tre laboratori (codice identificativo 3, 9, 16) invece non hanno raggiunto i criteri di conformità.
- La percentuale di accuratezza, specificità e sensibilità dei campioni di controllo (senza aggiunta di feci) è risultata pari rispettivamente a 99,59%, 98,15% e 100%.
- La percentuale di specificità dei campioni di feci artificialmente contaminati con dischetti bianchi è risultata pari al 97%.
- La percentuale complessiva di sensibilità dei campioni di feci artificialmente contaminati con dischetti contenenti STM (*S. Typhimurium*) ed SE (*S. Enteritidis*) è pari al 95%.
- L'isolamento di SE è risultato più critico rispetto a quello di STM, soprattutto quando sono stati testati i campioni a concentrazione più bassa (SE 50). La sensibilità raggiunta per i campioni contaminati con tale livello di contaminazione è pari al 78%.
- 6 dei 27 laboratori partecipanti non hanno rispettato quanto previsto dalla metodica di riferimento per il pre-arricchimento non selettivo dei campioni, prolungando la fase di pre-arricchimento per più di 20 ore.
- 4 laboratori inoltre non sono riusciti a rispettare i range di temperatura di incubazione del MSRVR previsti dalla metodica di riferimento.

# ALLEGATO 1

## PROTOCOLLO

### CIRCUITO INTERLABORATORIO IV (2011)

#### 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 (CRN) con lo scopo di testare l'abilità dei laboratori partecipanti di identificare la presenza di salmonelle in campioni di origine animale.

La metodica di riferimento da utilizzarsi nell'ambito di questo studio è quella riportata nell'Annex D della ISO 6579:2002, che si applica specificatamente all'identificazione di *Salmonella* spp. in campioni di feci di origine animale ed in campioni di tipo ambientale.

La metodica riportata nell'Annex D si differenzia da quella della ISO 6579 per il fatto che entrambi i terreni di arricchimento selettivi previsti dalla ISO 6579 vengono sostituiti da un unico terreno di arricchimento selettivo semi-solido denominato MSR/V (Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis).

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 pollo negative per *Salmonella* spp.

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 12 campioni di feci (10 grammi ciascuno e negativi per *Salmonella* spp.) addizionati con un dischetto contenente STM o SE non contenente alcun microrganismo e 10 controlli di cui 2 controlli di processo e gli 8 rimanenti costituiti da dischetti analizzati 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 le feci negative per salmonella; inoltre in ciascuna confezione verrà inserito, in una busta di plastica, il codice identificativo assegnato al laboratorio partecipante al test.

Il laboratorio ricevente dovrà segnalare al più presto eventuali problemi riscontrati all'apertura delle confezioni.

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

### **Schema dello studio**

Ciascun laboratorio partecipante riceverà un pacco contenente 2 sacchetti.

Sacchetto 1 (materiale da conservare a  $-20^{\circ} \pm 5$  C):

- 12 vials numerate contenenti un dischetto di *Salmonella* Typhimurium, o *Salmonella* Enteritidis o un dischetto non contenente alcun microrganismo (numerazione da 1 a 12);
- 8 vials di controllo contenenti un dischetto con o senza salmonella (numerazione da C1 a C8).

Sacchetto 2 (materiale da conservare a  $+4^{\circ}$ C):

- 200 g circa di feci di pollo (non contaminate con *Salmonella*).

Lo studio verrà effettuato contemporaneamente da tutti i laboratori coinvolti nel corso della prima settimana di ottobre.

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 CRN 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 IV (2011)

### 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 feci di pollo non contaminate da *Salmonella*.

#### 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."
- ✓ Amendment 1 to ISO 6579:2002. (2007) "Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in samples of the primary production stage"
- ✓ Regolamento (EC) 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
APTS	Acqua Peptonata Tamponata <i>Salmonella</i>
MSRV	Modified semi-solid Rappaport Vassiliadis medium
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate Agar
NA	Nutrient Agar
TSIA	Triple Sugar Iron Agar
LISINA	Lisina Decarbossilasi

#### 6 Terreni/Soluzioni/Reagenti

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

Terreno di pre-arricchimento non selettivo	APTS
Terreno di arricchimento selettivo	MSRV
Terreni di isolamento selettivo di isolamento selettivo a scelta (obbligatorio)	XLD (obbligatorio) + un secondo terreno
Triple Sugar Iron Agar	TSIA
Urea Agar	UA
l-Lysine decarboxylation medium	Lisina
Nutrient Agar	NA
Kit commerciale di identificazione biochimica	

La descrizione delle caratteristiche dei terreni e dei reagenti e le modalità di preparazione sono descritte nella ISO 6579:2002 e nell'Annex D.

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

- Acqua Peptonata Tamponata *Salmonella* (APTS)

##### 6.2 Terreno di arricchimento selettivo

- Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis (MSRV)
- Terreno di arricchimento selettivo comunemente utilizzato presso il laboratorio (**facoltativo**)

### 6.3 Terreni di isolamento selettivo differenziale

- Xylose-Lysine-Desoxycholate XLD
- Secondo terreno di isolamento selettivo comunemente utilizzato presso il laboratorio (**obbligatorio**)
- Eventuale altro terreno di isolamento selettivo comunemente utilizzato presso il laboratorio (**facoltativo**)

### 6.4 Prove Biochimiche

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

- Triple sugar/iron agar
- Urea agar
- l-Lysine decarboxylation medium (Brodo Lisina)

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)

Sigare 12 sacchetti sterili (o altro contenitore sterile) contenenti 90 ml di APTS (da 1 a 12). Sigare inoltre 10 sacchetti sterili con APTS (90 ml) da C1 a C10 (per i controlli). Porre i sacchetti con APTS in termostato o/n a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Porre in termostato anche qualche sacchetto aggiuntivo non sigilato contenente 90 ml di APTS da utilizzare nel caso in cui si accertino contaminazioni a carico dei sacchetti sigilati. Riportare nel Test Report le informazioni relative all'APTS.

### 7.3 Pre-aricchimento (giorno 1)

Porre a temperatura ambiente le vials contenenti il materiale di riferimento (campioni e controlli) circa 15 minuti prima di addizionarle ai sacchetti con APTS.

Poco prima di addizionare i dischetti tirare fuori dal termostato i sacchetti-contenitori con APTS, valutare visivamente l'eventuale crescita di contaminanti e scartare i sacchetti inquinati.

Aggiungere ciascun dischetto contenuto nelle vials numerate al corrispondente sacchetto-contenitore preventivamente sigilato; lasciare dissolvere i dischetti per 30 minuti e quindi agitare manualmente con vigore il contenuto di ciascun sacchetto.

Successivamente addizionare a ciascun sacchetto 10 grammi di feci come di seguito riportato:

- **Aggiungere 10 g di feci nei sacchetti sigilati da 1 a 12 e al sacchetto C10**
- **Non aggiungere feci ai sacchetti sigilati da C1 a C9**

***! Omogeneizzare delicatamente manualmente dopo aver aggiunto le feci***

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

**! Ai controlli C9 e C10 non andrà aggiunta la capsula, questi conterranno solo APTS (C9) e APTS con feci (C10)**

Porre tutti i sacchetti in termostato a  $37 \pm 1$  °C per  $18 \pm 2$  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 MSRV 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 MSRV nell'apposito spazio del Test Report.

Siglare 12 piastre di MSRV da 1 a 12 e 10 piastre da C1 a C10.

Inoculare le piastre di MSRV ponendo 3 gocce di brodocoltura in 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  $24 \pm 3$  h facendo attenzione a non capovolgerle. Se dopo le prime  $24 \pm 3$  h di incubazione le piastre risultano negative o dubbie reincubarle per ulteriori  $24 \pm 3$  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 di 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.

Siglare per ciascuno dei terreni utilizzati (XLD e secondo terreno a scelta) un numero sufficiente di piastre.

##### Primo isolamento dopo 24 h

Seminare, con l'ausilio di un'ansa sterile, nel terreno di isolamento selettivo, a partire da ciascuna piastra di MSRV sospetta positiva ed eventualmente da ciascun terreno di arricchimento selettivo opzionale.

Devono essere utilizzati i seguenti terreni di isolamento:

1) Xylose Lysine Desoxycholate agar (XLD)

(Porre le piastre rovesciate in termostato a  $37 \pm 1$  °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 h  $\pm$  3 h di incubazione esaminare le piastre ed identificare l'eventuale presenza di colonie riferibili a *Salmonella*.

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  $\pm$  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. Conservare le piastre con il terreno di isolamento a 4  $\pm$  3 °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 °C per 24  $\pm$  3 h.

Relativamente alle prove biochimiche in macrometodo si ritengono obbligatorie TSI, UA e LISINA, 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.

#### **Prove biochimiche**

Con l'ausilio di un'ansa sterile inoculare i terreni di seguito specificati selezionando una colonia caratteristica direttamente dal terreno di isolamento 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 agar**
- **Urea agar**
- **Lisina Decarbossilasi**

#### **TSI (Triple Sugar Iron agar)**

Seminare per infissione e strisciamento il TSI. Incubare a 37°C  $\pm$  1°C per 24  $\pm$  3 ore e procedere alla lettura:

Fondo: giallo = glucosio +; rosso o invariato = glucosio -; nero: produzione di idrogeno solforato; presenza di bolle di gas e/o sollevamento dell'agar = produzione di gas.

Superficie: giallo = lattosio o saccarosio positivo; rosso o invariato: lattosio e saccarosio negativo.



La crescita di Salmonella in TSI determina il viraggio del colore della parte inferiore del terreno verso il giallo, ma la precipitazione di H<sub>2</sub>S ne determina l'annerimento, inoltre spesso si formano bolle di gas, la porzione superiore a becco di clarino rimane rossa.

### **Urea**

Seminare per strisciamento il terreno Urea Agar incubare a 37° C ± 1°C per 24 ± 3 ore.

Se si verifica il viraggio del terreno dal giallo al rosa fucsia la prova risulta positiva (idrolisi dell'urea), mentre se il terreno mantiene il colore giallo la reazione è negativa.

### **Lisina Decarbossilasi:**

Seminare il brodo Lisina, incubare a 37° C ± 1°C per 24 ± 3 ore. In presenza dell'enzima lisina-decarbossilasi non si osserva alcun viraggio del colore del terreno (reazione positiva); in assenza dell'enzima il terreno diverrà giallo (reazione negativa).

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.

## **9 Test Report**

Nel Test Report verranno riportate tutte le informazioni che possono aver influenzato i risultati oltre che informazioni relativamente 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)**

<b>APTS</b>	
Data di preparazione	..... - ..... - 2011
N° di lotto	.....

<b>Pre-riscaldamento di APTS: tempo e temperatura</b>	
Inizio	Data: ..... - ..... - 2011 tempo: ..... h ..... min Temperatura termostato: ..... °C
Fine	Data: ..... - ..... - 2011 tempo: ..... h ..... min temperatura termostato: ..... °C

<b>Incubazione APTS: tempo e temperatura</b>	
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)**

<b>MSRV</b>	
Data di preparazione	..... - ..... - 2011
N° di lotto	.....

<b>Tempo e temperatura di incubazione del terreno di arricchimento MSRV</b>	
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 (seconde 24 ore)	Data: ..... - ..... - 2011 tempo: ..... h ..... min temperatura termostato: ..... °C
Fine successivo pre-arricchimento (seconde 24 ore)	Data: ..... - ..... - 2011 tempo: ..... h ..... min temperatura termostato: ..... °C

**PRIMO E SECONDO ISOLAMENTO- XLD**

<b>XLD</b>	
Data di preparazione	..... - ..... - 2011
N° di lotto	.....

<b>Tempo e temperatura di incubazione</b>	
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**

<b>Nome del terreno:</b>	
Data di preparazione	..... - ..... - 2011
N° di lotto	.....

<b>Tempo e temperatura di incubazione</b>	
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**

<b>AT</b>	
Data di preparazione	..... - ..... - 2011
N° di lotto	.....

**PROVE BIOCHIMICHE**

<b>Informazioni relativamente a TSI agar</b>	
Data preparazione	
N° di lotto	

<b>Informazioni relativamente a urea agar</b>	
Data preparazione	
N° di lotto	

<b>Informazioni relativamente a lisina decarbossilasi</b>	
Data preparazione	
N° di lotto	

<b>Informazioni relativamente a ulteriore prova di conferma biochimica (opzionale)</b>	
<b>Tipo di prova:</b> .....	
Data preparazione	
N° di lotto	

<b>Informazioni relativamente a ulteriore prova di conferma biochimica (opzionale)</b>	
<b>Tipo di prova:</b> .....	
Data preparazione	
N° di lotto	

<b>Informazioni relativamente a ulteriore prova di conferma biochimica (opzionale)</b>	
<b>Tipo di prova:</b> .....	
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 <sup>a</sup>	Sal <sup>b</sup>	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 MSRV (campioni numerati C1-C10)

C campione nO.	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 <sup>a</sup>	Sal <sup>b</sup>	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)

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 <sup>a</sup>	Sal <sup>b</sup>	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 MSR/V (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 <sup>a</sup>	Sal <sup>b</sup>	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:

<b>Nome del personale che hanno effettuato il test</b>	
<b>Data e firma</b>	

<b>Nome del responsabile del laboratorio</b>	
<b>Data e firma</b>	

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: lbarco@izsvenezie.it  
 csaccardin@izsvenezie.it