

Anno 2015

**Risultati I Circuito interlaboratorio nazionale:
isolamento *Salmonella* spp. da campioni di
origine animale, produzione primaria-
LABORATORI PRIVATI**

Indice

1. Introduzione.....	2
2. Laboratori Partecipanti.....	2
3. Materiali e metodi	3
3.1 Materiale di riferimento	3
3.2 Matrice.....	4
3.3 Spedizione del materiale.....	5
3.4 Documenti trasmessi ai laboratori partecipanti	5
4. Valutazione della performance e criteri di accettabilità	6
5. Risultati	6
5.1 Dati tecnici	6
5.2 Sintesi dei risultati.....	7
5.3 Valutazione della performance dei laboratori partecipanti.....	7
6. Conclusioni.....	9
ALLEGATO 1 - Protocollo operativo.....	10
2. Modalità operative.....	11

Indice tabelle

Tabella 1 - Calendario attività	3
Tabella 2: allestimento campioni di prova.....	5
Tabella 3 - Conformità e risultati dei singoli laboratori partecipanti	8

1. Introduzione

Uno dei principali compiti dei Centri di Referenza Comunitari e Nazionali, come stabilito anche dal 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.

Il circuito di seguito descritto è organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi (CRNS) allo scopo di valutare le capacità dei laboratori privati partecipanti di identificare *Salmonella* spp. in campioni di origine animale della produzione primaria.

Questo circuito di isolamento di *Salmonella* spp. da campioni di origine animale rappresenta il primo organizzato dal CRNS esclusivamente dedicato ai laboratori privati, a seguito di quanto previsto dalla nota del ministero della Salute, avente come oggetto "Piani Nazionali di Controllo Salmonellosi (PNCS) - identificazione dei laboratori privati che intendono eseguire le analisi dei campioni prelevati dagli OSA".

2. Laboratori Partecipanti

Al presente circuito hanno preso parte 49 laboratori privati, ciascuno dei quali è stato identificato con un codice numerico assegnato arbitrariamente.

Le attività pianificate nell'ambito del circuito sono state svolte secondo la tempistica definita nel calendario, anticipatamente inviato ai partecipanti (vedi tabella 1).

Pianificazione Circuito Interlaboratorio Isolamento e Identificazione di <i>Salmonella</i> spp. Edizione Laboratori privati SA3 -15	
Data	Attività
10/04/2015	Invio mail di pianificazione Il laboratorio partecipante avrà cura di procurarsi il materiale necessario per l'esecuzione del circuito
Dal 18/05/2015 Al 22/05/2015	Spedizione del materiale ai laboratori coinvolti tramite corriere. Immediatamente dopo l'arrivo del materiale ciascun laboratorio deve: <ul style="list-style-type: none">- Verificare la presenza di tutto il materiale previsto e del codice identificativo del laboratorio;- Conservare il materiale come segue: feci tra +2°C e +8°C; vials con i dischetti -20°C ± 5°C.<ul style="list-style-type: none">➤ Nel caso in cui il laboratorio non riceva il materiale nel periodo indicato, o vi siano anomalie del materiale consegnato, si prega di contattare tempestivamente il CNRS.
A partire dal 25/05/15	Esecuzione del circuito da parte del laboratorio partecipante.
Entro il 20/06/15	Inserimento dei risultati nel Test Report presente in AQUAWEB
Entro il 03/07/15	Trasmissione dei risultati dal CRNS ai singoli laboratori partecipanti

Tabella 1 - Calendario attività

3. Materiali e metodi

La metodica di riferimento impiegata nel presente circuito di isolamento di *Salmonella* spp. è quella riportata nella ISO 6579:2002/Amd1:2007 o, altro metodo alternativo utilizzato presso il laboratorio purché validato in accordo alla EN/ISO 16140.

3.1 Materiale di riferimento

Per l'esecuzione del circuito è stato utilizzato materiale di riferimento certificato, fornito dalla Public Health England (PHE) e commercializzato dalla ditta Oxoid Thermo Fisher Scientific. Nello specifico sono stati impiegati dischetti "bianchi" (non contenenti alcun microrganismo) e dischetti contenenti 120 ufc (unità formanti colonia) di *Salmonella* Typhimurium (STM).

Una volta ricevuto il materiale di riferimento dalla ditta produttrice il CRNS ha provveduto a conservarlo a -20 ± 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 comporti un'alterazione delle caratteristiche.

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

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 di prova; in particolare, sono state siglate da A1 ad A7 le provette contenenti i dischetti da utilizzare per allestire i campioni (contenenti la matrice), con codici C1 e C2 le provette con i dischetti da impiegare per allestire i controlli (in assenza di matrice).

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

– 4 dischetti contenenti 120 ufc di STM da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp.

– 5 dischetti “bianchi” non contenenti *Salmonella* spp. (3 da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp., 2 da analizzare in assenza di feci e corrispondenti ai controlli C1 e C2).

3.2 Matrice

Ai laboratori partecipanti sono state inviate aliquote di circa 200 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 ad omogenare adeguatamente le feci necessarie e successivamente a suddividerle in un numero di aliquote pari al numero dei partecipanti. 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* spp..

Inoltre, sul materiale fecale, al momento dell'arrivo presso il CRNS, sono stati eseguiti due controlli, relativi alla determinazione della Carica Mesofila Totale (procedura ISO 4833:2003) e degli Enterobatteri (procedura ISO 21528-2:2004). I risultati delle

analisi sono i seguenti: $7 \cdot 10^8$ ufc/g (carica mesofila totale) e 14.000 ufc/g (*Enterobacteriaceae*).

Le aliquote di feci destinate ai singoli partecipanti sono state conservate in sacchetti sigillati, mantenuti a temperatura di congelamento ($\leq 18^\circ\text{C}$) fino al momento della spedizione.

3.3 Spedizione del materiale

Il materiale per l'esecuzione del circuito, di cui ai punti precedenti, è stato inviato tramite una ditta specializzata per il trasporto di materiale biologico. Il trasporto è avvenuto a temperatura di refrigerazione. I laboratori partecipanti non hanno segnalato anomalie al momento della ricezione del materiale, tranne un laboratorio che ha segnalato la mancanza di un dischetto.

3.4 Documenti trasmessi ai laboratori partecipanti

A ciascun laboratorio partecipante è stato reso disponibile nel gestionale AQUAWEB, anticipatamente rispetto all'esecuzione delle analisi, il protocollo operativo (allegato 1), contenente indicazioni anche sulle modalità di trasmissione dei risultati e della scheda di sicurezza dei campioni inviati.

In sintesi il protocollo prevedeva che ciascun laboratorio testasse 11 campioni di prova (7 campioni siglati da A1 ad A7 e 4 controlli siglati da C1 a C4), allestiti in accordo a quanto riportato in tabella 2.

Campione di prova	APTS 225 ml	DISCHETTO	FECI 25g
A1	SI	SI	SI
A2	SI	SI	SI
A3	SI	SI	SI
A4	SI	SI	SI
A5	SI	SI	SI
A6	SI	SI	SI
A7	SI	SI	SI
C1	SI	SI	NO
C2	SI	SI	NO
C3	SI	NO	SI
C4	SI	NO	NO

Tabella 2: allestimento campioni di prova

4. Valutazione della performance e criteri di accettabilità

I risultati trasmessi dai laboratori partecipanti, ovvero l'indicazione di presenza/assenza di *Salmonella* spp. nei controlli (da C1 a C4) e nei campioni (da A1 ad A7) sono stati confrontati con il risultato atteso.

Sono stati definiti dei criteri di accettabilità per identificare i laboratori con performance non soddisfacente. Nella valutazione delle performance si è tenuto conto delle analisi non eseguite (fatto salvo quelle non eseguite per materiale non pervenuto), attribuendo un peso differenziato, ovvero non è stato considerato accettabile la mancanza di esecuzione di un numero di analisi relative ai campioni (da A1 ad A7) maggiore di 1.

Si riportano di seguito sinteticamente i criteri di accettabilità: :

- _ **controllo negativo in assenza di matrice "C1-C2-C4"** : accettabile 0 errori;
- _ **campione negativo in presenza di matrice**:accettabile 1 errore;
- _ **campione positivo in presenza di matrice** : accettabile 1 errore.

5. Risultati

5.1 Dati tecnici

Tutti i laboratori hanno utilizzato quale metodo di prova quello descritto nella ISO 6579:2002/Amd1:2007. Tre laboratori hanno dichiarato di avere utilizzato in parallelo metodi alternativi ed in particolare: metodo interno (L452); AFNOR ABI (L520) e AFNOR BRD (L612).

In ogni caso è stato trasmesso il risultato esitato dall'applicazione del metodo ISO 6579:2002/Amd1:2007.

Tutti i laboratori hanno rapidamente posto il materiale alla temperatura di conservazione indicata, tranne 5 laboratori che hanno indicato un tempo pari o superiore a 60 minuti tra l'arrivo del materiale e lo stoccaggio. Si tratta in ogni caso di 5 laboratori con performance soddisfacente.

Ai laboratori era stato chiesto di fornire dettagli in particolare per quanto riguarda tempi e temperatura relative alla fase di pre-arricchimento in APTS. La temperatura è sempre stata all'interno del range indicato dalla procedura (37+/- 1°C), mentre per quanto

riguarda i tempi, 15 laboratori hanno indicato tempi di incubazione superiori al limite massimo previsto dalla ISO di riferimento (18+/-2 ore) ovvero superiori alle 20 ore. Dalla valutazione dei risultati si deduce comunque che la performance non soddisfacente non può essere esclusivamente imputabile ad un tempo di incubazione superiore alle 20 ore in quanto tra i 15 laboratori ve ne sono 11 che hanno avuto risultati soddisfacenti.

5.2 Sintesi dei risultati

Controlli da C1 a C4

Tutti i laboratori hanno identificato correttamente i controlli da C1 a C4, tranne un laboratorio che ha identificato la presenza di *Salmonella* spp. nel controllo C1 (risultato non accettabile).

Un laboratorio non ha eseguito il controllo C4.

Campioni da A1 ad A7

Due laboratori non hanno identificato la presenza di *Salmonella* spp. in due campioni su 4.

Un laboratorio non ha eseguito due test su quattro.

Un laboratorio non ha identificato la presenza di *Salmonella* spp. in tre campioni su 4 ed un laboratorio ha riportato risultato errato per tutti e 4 i campioni inquinati artificialmente.

I risultati di questi 5 laboratori, sulla base dei criteri di accettabilità definiti, non sono considerati soddisfacenti.

Sei laboratori non hanno identificato la presenza *Salmonella* spp. in un campioni su quattro. Un laboratorio non ha eseguito un test su quattro.

Per quanto riguarda i tre campioni addizionati con dischetti "bianchi", tre laboratori hanno segnalato la presenza di *Salmonella* spp.

5.3 Valutazione della performance dei laboratori partecipanti

In tabella 3 viene riportato l'elenco dei laboratori e relativo soddisfacimento dei criteri di accettabilità della performance.

CODICE IDENTIFICATIVO LABORATORIO	CONFORMITA' AI CRITERI DEFINITI PER I CONTROLLI	CONFORMITA' AI CRITERI DEFINITI PER I CAMPIONI POSITIVI (A1-A3-A4-A7)	CONFORMITA' AI CRITERI DEFINITI PER I CAMPIONI NEGATIVI (A2-A5-A6)
L000324	OK	OK	OK
L000346	OK	OK	OK
L000356	OK	OK	OK
L000364	OK	NO	OK
L000452	OK	OK	OK
L000474	OK	OK	OK
L000491	OK	OK	OK
L000492	OK	OK	OK
L000500	OK	OK	OK
L000516	OK	OK	OK
L000520	OK	OK	OK
L000523	OK	OK	OK
L000559	OK	OK	OK
L000560	OK	OK	OK
L000561	OK	OK	OK
L000568	OK	OK	OK
L000577	OK	NO	OK
L000578	OK	OK	OK
L000580	OK	OK	OK
L000584	OK	OK	OK
L000587	OK	OK	OK
L000590	OK	OK	OK
L000591	OK	NO	OK
L000592	OK	OK	OK
L000593	OK	OK	OK
L000595	OK	OK	OK
L000598	OK	OK	OK
L000599	OK	OK	OK
L000600	OK	OK	OK
L000601	OK	OK	OK
L000602	OK	OK	OK
L000603	OK	OK	OK
L000604	OK	OK	OK
L000605	OK	OK	OK
L000606	OK	OK	OK
L000607	NO	OK	OK
L000608	OK	OK	OK
L000609	OK	OK	OK
L000610	OK	NO	OK
L000611	OK	OK	OK
L000612	OK	OK	OK
L000613	OK	OK	OK
L000614	OK	OK	OK
L000617	OK	OK	OK
L000619	OK	OK	OK
L000620	OK	OK	OK
L000622	OK	OK	OK
L000623	OK	NO	OK
L000627	OK	OK	OK

Tabella 3 - Conformità e risultati dei singoli laboratori partecipanti

6. Conclusioni

Dei 49 laboratori privati partecipanti 6 sono risultati non soddisfare i criteri minimi previsti: L364; L577; L591; L607; L610; L623, di conseguenza verranno contattati ed informati sulle modalità e tempi previsti per l'identificazione di misure correttive e sulle modalità e tempi relativi ai controlli di follow-up.

ALLEGATO 1 – Protocollo operativo

PROTOCOLLO

Ai laboratori partecipanti

OGGETTO: Circuito Interlaboratorio Isolamento e Identificazione di *Salmonella* spp.

Edizione Laboratori privati schema **SA3-2015**.

1. Obiettivi

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 la competenza nell'identificazione di *Salmonella* spp. in campioni di origine animale prelevati a livello di produzione primaria.

I laboratori dovranno impiegare la metodica utilizzata di routine per analizzare i campioni prelevati nell'ambito del Piano Nazionale di Controllo Salmonellosi negli avicoli.

Nella la preparazione dei campioni da sottoporre ad indagine è utilizzato materiale di riferimento certificato, che consiste in dischetti di *Salmonella* spp. , dischetti “bianchi” negativi e feci di pollo negative per *Salmonella* spp.

I laboratori dovranno allestire i campioni di prova provvedendo a contaminare le feci negative per *Salmonella* spp. con il materiali di riferimento. Inoltre, verranno analizzati dei campioni di controllo costituiti dal materiale di riferimento in assenza della matrice (feci).

Il materiale trasmesso ai laboratori sarà confezionato in un contenitore di plastica contenente 8 sacchetti con feci di pollo negative per *Salmonella* spp. e 9 vials contenenti i dischetti.

Ciascun laboratorio partecipante riceverà il materiale dello studio suddiviso in 2 sacchetti:

sacchetto 1 (Materiale di riferimento: vials contenenti dischetti da conservare a $-20^{\circ} \pm 5^{\circ}C$):

- 7 vials (numerazione da A1 a A7) per la preparazione dei campioni da A1 a A7;
- 2 vials di controllo (numerazione C1, C2) per la preparazione dei controlli C1 e C2.

sacchetto 2 (feci da conservare tra $+2^{\circ}C$ e $+8^{\circ}C$):

- 8 sacchetti di cui 7, siglati da A1 a A7 contenenti le feci per allestire i campione da A1 a A7;
- il sacchetto C3 da utilizzare per allestire il “controllo matrice”.

Ciascun sacchetto contiene circa 30 g di feci di pollo da cui i laboratori partecipanti preleveranno i 25 g necessari per la fase di allestimento dei campioni di prova (come descritto al punto 2.1).

Il materiale sarà inviato a ciascun partecipante tramite corriere.

I laboratori coinvolti dovranno contattare urgentemente il Centro di Referenza per le Salmonellosi (CRNS) in caso di mancato recapito del materiale entro 3 giorni lavorativi dalla data di spedizione prevista e segnalare all'organizzatore al più presto eventuali problemi riscontrati all'apertura delle confezioni.

2. Modalità operative

Ciascun laboratorio esaminerà 10 campioni di cui 7 campioni di feci siglati da A1 a A7 contenenti dischetto + feci e 3 controlli (C1,C2,C3)

I campioni (**A1 a A7**) verranno allestiti dai partecipanti aggiungendo nella prima fase APTS e il materiale di riferimento (dischetto) corrispondente e successivamente i 25g pesati della matrice.

I controlli (da C1 a C3) comprendono 2 controlli (**C1 e C2**) da allestire aggiungendo un dischetto all' APTS e un controllo (**C3**) definito come "controllo matrice " da allestire aggiungendo alle feci l'APTS (senza aggiunta di dischetto). Infine, ciascun partecipante dovrà aggiungere il controllo (**C4**) che consisterà nella sola analisi dell'APTS..

I terreni/ Kit o reagenti necessari ai fini dello studio NON verranno forniti dal CRNS

2.1 Pre-arricchimento dell'APTS (giorno 1)

Utilizzare APTS a temperatura ambiente.

➤ **Preparazione campioni e controllo matrice C3**

Preparare 8 sacchetti (o altro contenitore) sterile **da siglare da A1 a A7 e C3**, aggiungere 225 ml di APTS a ciascun sacchetto.

➤ **Preparazione controlli**

Aggiungere ai sacchetti **C1 e C2** 225 ml di APTS .

Porre i sacchetti campioni e controlli con APTS in termostato a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

➤ **Fase di contaminazione**

Porre a temperatura ambiente le vials contenenti i dischetti circa 15 minuti prima di addizionarle ai sacchetti con APTS.

Aggiungere ciascun dischetto contenuto nelle vials numerate al corrispondente sacchetto-contenitore precedentemente siglato; lasciare dissolvere i dischetti per 15-20 minuti, in termostato a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ quindi agitare manualmente il contenuto di ciascun sacchetto.

➤ **2° Fase: aggiunta matrice**

Aggiungere 25 g di feci prelevati da ciascun sacchetto fornito dal circuito.

! Si raccomanda di rispettare scrupolosamente la corrispondenza numerica sacchetto-dischetto.

! Non aggiungere feci ai sacchetti siglati da C1 a C2.

! Omogeneizzare delicatamente manualmente.

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

! Ai controlli C3 e C4 non andrà aggiunto alcun dischetto, questi conterranno solo APTS con feci (C3) e solo APTS (C4).

Tabella riassuntiva delle fasi operative descritte: :

Campione di prova	APTS 225 ml	DISCHETTO	FECI 25g
A1	SI	SI	SI
A2	SI	SI	SI
A3	SI	SI	SI
A4	SI	SI	SI
A5	SI	SI	SI
A6	SI	SI	SI
A7	SI	SI	SI
C1	SI	SI	NO
C2	SI	SI	NO
C3	SI	NO	SI
C4	SI	NO	NO

Porre tutti i sacchetti 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.

Terminata la fase di incubazione i campione e i controlli sono esaminati secondo il metodi in uso presso ciascun laboratorio partecipante.

Il circuito verrà effettuato contemporaneamente da tutti i laboratori coinvolti a partire **dal 25 maggio 2015.**

In **AQUAWEB** in schema SA3-2015 sono presenti:

- **Pianificazione in dettaglio**
- **Protocollo con le modalità operative.**

La **Scheda di sicurezza** dei campioni inviati è disponibile nel sito dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (<http://www.izsvenezie.it/servizi/circuito-interlaboratorio-aqua/>)

3. Trasmissione dei risultati

Al termine delle prove, inserire i risultati nel Test Report SA3-15 presente in AQUAWEB entro e non oltre il **20 giugno 2015**.

!Nessuna altra modalità di trasmissione potrà essere accettata e dopo la data indicata il Test report non sarà più accessibile.

L'esito del Circuito da parte del CRNS prevede la pubblicazione in AQUAWEB del report parziale in cui è riportato il risultato atteso per ciascun campione di prova entro il **03 luglio 2015**.

Legnaro, 22/04/2015

Dr.ssa Antonia Ricci Tel 049.8084296 E-mail aricci@izsvenezie.it
Dr.ssa Cristina Saccardin Tel. 049 8084283-293 E-mail csaccardin@izsvenezie.it

Nota

I laboratori sono resi anonimi e identificati solo tramite codici alfa-numeric (Informativa ex art. 13 del D.Lgs. n. 196/30.6.2003 e s.m. e i. "Codice in materia di protezione dei dati personali"):

– i dati acquisiti sono utilizzati dall'Istituto per il Circuito Interlaboratorio AQUA e la gestione delle attività correlate;

– le attività comportanti il trattamento dei dati conferiti sono svolte per conseguire finalità a carattere istituzionale;

– il trattamento dei dati è effettuato sia con strumenti informatici che cartacei da parte dei servizi dell'Istituto;

– il titolare del trattamento è l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie in persona del Direttore Generale con sede in Legnaro (PD) – Viale dell'Università, 10 e il Responsabile della Struttura Complessa SCS1– Analisi del rischio e sorveglianza in sanità pubblica è la dott.ssa Antonia Ricci.

– **l'interessato potrà esercitare i diritti di cui all'art. 7 del D.Lgs. n. 196/2003 rivolgendosi all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie con sede in Legnaro (PD) – Viale dell'Università, 10).**

Responsabile circuito

Dott.ssa Antonia Ricci Tel. 049 8084296 e-mail aricci@izsvenezie.it

Responsabile tecnico

Dott.ssa Cristina Saccardin Tel. 049 8084283 e-mail csaccardin@izsvenezie.it

Il presente report è a cura di

Dott.ssa Veronica Cibin, dott.ssa Cristina Saccardin, dott.ssa Antonia Ricci

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

SCS1 Analisi del Rischio e Sorveglianza in Sanità Pubblica

V.le dell'Università 10 - 35020 LEGNARO (PD)

www.izsvenezie.it