

Anno 2017

**Risultati X Circuito Interlaboratorio
Nazionale, Anno 2017:
Isolamento Salmonella spp. da campioni
di origine animale produzione primaria**

Sommario

1. INTRODUZIONE	2
2. LABORATORI PARTECIPANTI.....	2
3. MATERIALI E METODI	5
3.1 MATERIALE DI RIFERIMENTO	5
3.2 MATRICE	6
3.3 DOCUMENTI TRASMESSI AI LABORATORI PARTECIPANTI	7
4. ANALISI DEI DATI.....	8
5. CRITERI PER LA DEFINIZIONE DI “BUONA PERFORMANCE”.....	8
6. RISULTATI.....	9
6.1 VALUTAZIONE DATI TECNICI	9
6.2 CAMPIONI CONTROLLO	11
6.3 CAMPIONI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI	11
6.4 VALUTAZIONE DELLA PERFORMANCE DEI LABORATORI PARTECIPANTI.....	12
7. CONCLUSIONI	13

Indice tabelle

TAB. 1 ELENCO DEI LABORATORI ISCRITTI AL CIRCUITO.	3
TAB. 2 CALENDARIO DELLE ATTIVITÀ	4
TAB. 3 TIPO E NUMERO DI DISCHETTI TESTATI DAI LABORATORI PARTECIPANTI.	7
TAB. 4 CRITERI DI CONFORMITÀ PER CAMPIONI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI CON DISCHETTO CONTENENTE UN LIVELLO NOTO DI SALMONELLA TYPHIMURIUM (STMH = ALTA CARICA; STML = BASSA CARICA).....	9
TAB. 5 CRITERI DI CONFORMITÀ PER CAMPIONI E CONTROLLI NON CONTAMINATI.....	9
TAB. 6 LABORATORI CHE HANNO REGISTRATO TEMPI E/O TEMPERATURE D’INCUBAZIONE DELLA FASE DI PRE-ARRICCHIMENTO CHE SI DISCOSTANO DAL METODO DI RIFERIMENTO.	10
TAB. 7 VALORI DI SPECIFICITÀ, SENSIBILITÀ E ACCURATEZZA COMPLESSIVI OTTENUTI VALUTANDO LE PERFORMANCE OTTENUTE DEI LABORATORI PARTECIPANTI (32) SUI CAMPIONI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI CON FECI NEGATIVE PER SALMONELLA SPP. .	12

REPORT DEFINITIVO

X Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2017:

Isolamento *Salmonella* spp. da campioni di origine animale produzione primaria

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 alcuni sierotipi di *Salmonella* spp. (considerati rilevanti per la salute pubblica) in determinate specie produttive.

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

L'attuazione periodica del circuito permette inoltre di valutare nel tempo la qualità dei risultati dei singoli partecipanti.

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

Questo circuito ha previsto l'esclusiva partecipazione dei laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) ed è stato gestito attraverso la piattaforma AQUAWEB dell'IZS Venezie.

2. Laboratori Partecipanti

Al presente circuito si sono iscritti 32 laboratori afferenti agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

Di seguito viene riportata la lista dei laboratori iscritti (e referente), ciascuno dei quali è stato identificato con un codice numerico assegnato arbitrariamente.

REPORT DEFINITIVO

X Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2017:

Isolamento *Salmonella* spp. da campioni di origine animale produzione primaria

LABORATORIO	REFERENTE
IZS ABRUZZO E MOLISE - SEZIONE DIAGNOSTICA DI AVEZZANO	DR. MAURO DI VENTURA
IZS ABRUZZO E MOLISE - SEZIONE DIAGNOSTICA DI PESCARA	DR.SSA DANIELA MORELLI
IZS ABRUZZO E MOLISE - SEZIONE DIAGNOSTICA DI LANCIANO	DR.SSA DANIELA MORELLI
IZS ABRUZZO E MOLISE - SEZIONE DI CAMPOBASSO	DR. LUCIO MARINO
IZS LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA - SEZIONE DIAGNOSTICA DI SONDRIO	DR.SSA IRENE BERTOLETTI
IZS LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA - SEZIONE DI BOLOGNA	DR. GIUSEPPE MERIALDI
IZS LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA - SEZIONE DI PARMA	DR. STEFANO PONGOLINI
IZS LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA - SEZIONE DIAGNOSTICA DI MANTOVA	DR. NIGRELLI ARRIGO
IZS LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA - SEZIONE DIAGNOSTICA DI BINAGO	DR.SSA CRISTINA SACCHI
IZS LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA - SEZIONE DI MODENA	DR. BASSI STEFANO
IZS LAZIO E TOSCANA - DIREZIONE OPERATIVA DIAGNOSTICA GENERALE	DR. ANTONIO BATTISTI
IZS DEL MEZZOGIORNO - PORTICI U.O. DIAGNOSTICA GENERALE	DR. ANNA CERRONE
IZS DEL MEZZOGIORNO - SEZIONE DIAGNOSTICA DI COSENZA	DR.SSA GIULIA MANCUSO
IZS DEL MEZZOGIORNO - SEZIONE DIAGNOSTICA DI AVELLINO	DR. UGO MARIANI
IZS PUGLIA E BASILICATA - STRUTTURA COMPLESSA TERRITORIALE DI TARANTO	DR.SSA LAURA GUARINO
IZS PUGLIA E BASILICATA - SEDE DI PUTIGNANO (BARI)	DR. COSIMO MONTAGNA
IZS PUGLIA E BASILICATA - S.C. DIAGNOSTICA	DR. PASQUALE TROIANO
IZS PUGLIA E BASILICATA - SEZIONE DIAGNOSTICA PROVINCIALE DI BRINDISI	DR. LORENZO DE BELLIS
IZS PUGLIA E BASILICATA - POTENZA	DR.SSA LUCIA PALAZZO
IZS PIEMONTE LIGURIA E VALLE D'AOSTA - SEZIONE DI NOVARA	DR. ETTORE FONTANA
IZS PIEMONTE LIGURIA E VALLE D'AOSTA - LABORATORIO PATOLOGIA ANIMALE E STABULARIO	DR. ALESSANDRO DONDO
IZS SARDEGNA - LABORATORIO DI BATTERIOLOGIA SPECIALE	DR. STEFANO A. LOLLAI
IZS SICILIA - AREA DI RAGUSA	DR. GIUSEPPE CASCONI
IZS SICILIA - AREA CATANIA	DR.SSA A.M.F. MARINO
IZS SICILIA - MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI - AREA BARCELLONA P.G.	DR. MICHELE FIASCONARO
IZS SICILIA - A.A.T.I.	DR. DOMENICO VICARI
IZS SICILIA - AREA TERRITORIALE DI CALTANISSETTA LAB. ATTIVITÀ ASSISTENZA TERRITORIALE INTERPROVINCIALE	DR. FRANCESCO CAMPO
IZS UMBRIA E MARCHE - LABORATORIO DIAGNOSTICA, PERUGIA	DR.SSA PAOLA PAPA
IZS UMBRIA E MARCHE - SEZIONE DI TOLENTINO (MC)	DR.GIANNI PERUGINI
IZS VENEZIE - SCT5 TRENTO	DR. GIOVANNI FARINA
IZS VENEZIE - SCT1 VICENZA	DR. ANTONIO BARBERIO
IZS VENEZIE - SCT2 TREVISO	DR. FABRIZIO AGNOLETTI

Tab. 1 Elenco dei Laboratori iscritti al Circuito.

REPORT DEFINITIVO

X Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2017:

Isolamento *Salmonella* spp. da campioni di origine animale produzione primaria

Le attività pianificate nell'ambito del circuito sono state svolte secondo la tempistica definita nel calendario, anticipatamente pubblicato in piattaforma AQUAWEB (vedi tabella 2).

Calendario delle attività previste nell'ambito del X Circuito Interlaboratorio Isolamento SA4 2017

Scadenze	Azioni
Entro 27/10/17	<p>Publicazione pianificazione e protocollo delle modalità operative.</p> <p><i>Si ricorda che ciascun laboratorio dovrà procedere a procurarsi il materiale necessario, come indicato nel protocollo.</i></p>
Dal 13/11/17 Al 17/11/17	<p>Spedizione del materiale ai laboratori coinvolti tramite corriere.</p> <p>Immediatamente dopo l'arrivo del materiale ciascun laboratorio deve:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Verificare la presenza di pacchetti danneggiati (i pacchetti danneggiati non devono essere utilizzati) - Conservare il materiale come segue: feci tra +2°C e +8°C ; vials con i dischetti -20°C ± 6°C. <p>A mancata ricezione seguirà immediata comunicazione al CRNS via e-mail (circuitisalmisolamento@izsvenezie.it)</p>
Dal 20/11/17 AL 24/11/17	Effettuazione del circuito
Entro 18/12/17	<p>Inserimento dei dati (risultati) nel Test Report presente in AQUAWEB .</p> <p><i>Non sarò possibile inserire risultati oltre la data indicata, inoltre risultati inviati con altre modalità non verranno presi in considerazione</i></p>
Entro 22/01/18	Publicazione in AQUAWEB del report parziale con indicazione del risultato atteso

Tab. 2 Calendario delle attività

REPORT DEFINITIVO

X Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2017:

Isolamento *Salmonella* spp. da campioni di origine animale produzione primaria

3. Materiali e metodi

La metodica di riferimento impiegata nel presente circuito di isolamento di *Salmonella* spp. è quella riportata nella ISO 6579-1:2017 (escluso Annex D).

3.1 Materiale di riferimento

Per l'esecuzione del circuito è stato utilizzato materiale di riferimento certificato (VitroidsTM), commercializzato dalla ditta SIGMA-ALDRICH S.r.l. Nello specifico sono stati impiegati dischetti "bianchi" (non contenenti alcun microrganismo), dischetti contenenti 42-79 ufc1 (bassa carica) e dischetti contenenti 75-139 ufc1 (alta carica) di *Salmonella* Typhimurium (STM).¹

Una volta ricevuto il materiale di riferimento il CRNS ha provveduto a conservarlo a -20 ± 5 °C, temperatura che permette di garantirne la stabilità per lunghissimi periodi. In ogni caso il produttore garantisce la stabilità del prodotto anche in caso di esposizione a temperatura ambiente per brevi periodi.

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 A15 le provette contenenti i dischetti da utilizzare per allestire i campioni (contenenti la matrice), con codice C1 la provetta con i dischetto da impiegare per allestire il controllo C1 (in assenza di matrice).

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

- 6 dischetti contenenti STM alta carica, da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp. A1, A3, A6, A7, A12, A15;
- 6 dischetti contenenti STM, bassa carica da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp. A2, A4, A5, A8, A11, A14;

¹ Valori corrispondenti al valore medio fornito dalla ditta produttrice calcolati valutando la contaminazione di un numero statisticamente significativo di dischetti rispettivamente utilizzando il terreno XLD e TSA.

- 4 dischetti “bianchi” non contenenti *Salmonella* spp. (3 da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp. A9, A10, A13 ed uno da analizzare in assenza di feci e corrispondente al controllo C1).

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 si è proceduto a valutare la negatività per *Salmonella* spp. delle feci prelevate in accordo a quanto previsto dalla istruzione operativa di struttura. Tale procedura prevede di omogenare adeguatamente le feci e successivamente suddividerle in un numero di aliquote pari al numero dei partecipanti e di testarne un numero pari a 10 (25 g di matrice ciascuno). Tutte le aliquote analizzate in accordo alla metodica definita nella ISO 6579-1:2017 (escluso Annex D) sono risultate negative 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: $72 \cdot 10^8$ ufc/g (carica mesofila totale) e $19 \cdot 10^4$ 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.

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

- 200 g circa di feci di pollo;
- 1 dischetto C1 “controllo” (da testare senza aggiunta di feci);
- 15 dischetti numerati da 1 a 15 per allestire i campioni.

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

Dischetti	Dischetti controllo (n=1)	Dischetti campione (n=15)
S. Typhimurium alta carica (STMH)	0	6
S. Typhimurium bassa carica (STML)	0	6
Bianco	1	3

Tab. 3 Tipo e numero di dischetti testati dai laboratori partecipanti.

Il materiale per l'esecuzione del circuito è stato quindi inviato agli Istituti 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. Il CRNS effettua inoltre una verifica della stabilità dei campioni prova (matrice unita al materiale di riferimento), in termini di concordanza/discordanza con il risultato atteso, analizzando 7 campioni prova il primo giorno previsto per l'esecuzione del circuito e i rimanenti 7 l'ultimo giorno secondo quanto indicato dalla ISO 13528:2015.

3.3 Documenti trasmessi ai laboratori partecipanti

Anticipatamente rispetto all'esecuzione delle analisi è stata pubblicata in piattaforma AQUAWEB la seguente documentazione:

- Indicazioni Generali 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;
- La Scheda di Sicurezza del Circuito, è disponibile nella parte pubblica del sito <http://www.izsvenezie.it>.

4. Analisi dei dati

Specificità, sensibilità e accuratezza ottenute complessivamente dai laboratori partecipanti sono state calcolate come indicato di seguito.

Specificità:	<u>Numero di risultati negativi</u>	x 100%
	Numero totale di campioni realmente negativi	
Sensibilità:	<u>Numero di risultati positivi</u>	x 100%
	Numero totale di campioni realmente positivi	
Accuratezza:	<u>Numero di risultati corretti (positivi e negativi)</u>	x 100%
	Numero totale di campioni (positivi e negativi)	

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”

Nelle tabelle seguenti sono riportati i criteri stabiliti dal CRNS per la definizione della buona performance dei laboratori partecipanti al presente circuito.

In Tabella 4 vengono indicati i risultati minimi, in termini di risultati corretti, per quanto riguarda i campioni contaminati con STMH e STML. Per quanto riguarda STMH è considerato accettabile un numero di errori paria a 1; per STML è considerato accettabile un numero di errori paria a 2; è altresì considerato non accettabile un numero di errori nell'identificare i campioni contaminati con *S. Typhimurium* nel complesso (STMH + STML) pari o maggiore di 3.

Per quanto riguarda i campioni contaminati con dischetti bianchi, poiché non può esserci la garanzia di negatività per l'analisi per tutti i pool di feci inviati ai laboratori, è considerato accettabile un esito positivo per uno dei tre campioni bianchi testati.

In Tabella 5 vengono indicati i limiti di accettabilità, in termini di risultati errati, per i controlli ed i campioni cui è stato addizionato un dischetto non contenente alcun microorganismo.

In entrambi i casi è ammesso un errore.

	Risultati minimi	
CAMPIONI	% positivi	N° campioni positivi/ N° totale di campioni
STMH (alta carica)	~83%	5/6
STML (bassa carica)	~66%	4/6

Tab. 4 Criteri di conformità per campioni artificialmente contaminati con dischetto contenente un livello noto di *Salmonella* Typhimurium (STMH = alta carica; STML = bassa carica).

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

Tab. 5 Criteri di conformità per campioni e controlli non contaminati

*sono considerati sia il controllo C1 (dischetto "bianco" +APTS) che i controlli C2 (APTS) e C3 (feci +APTS).

** la tolleranza sulla positività è limitata al solo controllo feci-APTS (C3)

*** è stato considerato come accettabile un esito positivo per uno dei tre campioni bianchi testati.

6. Risultati

6.1 Valutazione dati tecnici

Tutti i laboratori hanno utilizzato il metodo descritto nella ISO 6579-1:2017 (escluso Annex D). Cinque laboratori hanno utilizzato anche metodi alternativi.

Tutti i laboratori hanno utilizzato MSR/V come terreno di arricchimento selettivo e XLD come primo terreno selettivo-differenziale, conformemente a quanto indicato nella Procedura Operativa.

Per quanto riguarda il secondo terreno selettivo-differenziale, BGA è stato utilizzato da 15 laboratori, Rambach da 9 laboratori, BSA da 2 laboratori, Salmonella Shigella Agar da 2 laboratori, 2 laboratori hanno utilizzato un terreno cromogenico per Salmonella ed infine 2

REPORT DEFINITIVO

X Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2017:

Isolamento *Salmonella* spp. da campioni di origine animale produzione primaria

laboratori hanno utilizzato oltre che ad un secondo terreno selettivo differenziale (rispettivamente BGA e BSA) anche un terzo terreno (Hektoen Enteric Agar e Rambach Agar rispettivamente).

Per quanto riguarda le prove biochimiche tutti i laboratori tranne 1 (L000504, che ha utilizzato esclusivamente i test in macrometodo) hanno utilizzato un kit commerciale.

I laboratori L000384, L000389, L000503, L000557, L000632 e L000733) oltre al kit commerciale hanno effettuato anche le prove biochimiche in macrometodo,

Di seguito (Tabella 6) vengono evidenziate le deviazioni in termini di tempo, rispetto alla ISO 6579-1:2017 (escluso Annex D), in merito in particolare alla fase di pre-arricchimento.

Per quanto riguarda la temperatura ed il tempo di incubazione del terreno di arricchimento selettivo MSR/V il laboratorio L000480 ha riportato una temperatura rilevata alla fine del primo periodo di incubazione non conformi (pari a 37°C) mentre il laboratorio L000396 ha rilevato in corrispondenza del primo periodo di incubazione una temperatura leggermente inferiore a quella prevista, ovvero pari a 39,3-39,9 °C Il tempo di incubazione è sempre risultato conforme e compreso tra 24 +/- 3 ore.

Pre-arricchimento APTS	
Codice identificativo del laboratorio	Tempo di incubazione in ore
	16-20
L000359	24
L000375	24
L000384	21:50
L000460	24
L000480	23:30
L000504	24
L000557	24
L000586	22
L000671	24
L000733	24

Tab. 6 Laboratori che hanno registrato tempi e/o temperature d'incubazione della fase di pre-arricchimento che si discostano dal metodo di riferimento.

In totale 8 laboratori hanno utilizzato tempi di pre-arricchimento in APTS diversi rispetto a quanto previsto dalla procedura di riferimento.

Inoltre il laboratorio L000376 ha riportato come data di inizio pre-arricchimento 4/12/2017, ovvero due settimane dopo rispetto a quella identificata da calendario.

In merito alla conferma sierologica i laboratori L000384, L000441, L000455, L000485, L000671, L000734, risulta non l'abbiano effettuata.

6.2 Campioni controllo

Risultati campioni controllo C2-C3

Tutti i laboratori hanno identificato correttamente i controlli C2 e C3.

Campione di controllo "bianco" C1

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

6.3 Campioni artificialmente contaminati

Dischetti bianchi (n=3)

I tre campioni con "dischetti bianchi" (A9; A10; A13) a cui sono state aggiunte le feci negative per *Salmonella* spp. sono stati identificati come negativi da tutti i partecipanti tranne che dal laboratorio L000352 che ha segnalato presenza nel campione identificato A9.

Dischetti *Salmonella* Typhimurium alta carica (n=6)

Tutti i laboratori hanno fornito esito positivo per tutti i campioni contaminati con STMH (A1; A3; A6; A7; A12; A15).

Dischetti *Salmonella* Typhimurium bassa carica (n=6)

Tutti i laboratori, hanno fornito esito positivo per i campioni contaminati con STML (A2; A4; A5; A8; A11; A14) tranne il laboratorio L000734 che non ha identificato la presenza di STML nel campione A8.

In tabella 7 sono riportati i valori di sensibilità, specificità e accuratezza dei campioni di prova artificialmente contaminati.

CAMPIONI DI PROVA		MSRV/terreno selettivo
Dischetti "bianchi" (3 per lab)	N° di campioni	96
	Campioni negativi	95
	Specificità in %	99%
STMH (6 per lab)	N° di campioni	192
	Campioni positivi	191
	Sensibilità in %	99%
STML (6 per lab)	N° di campioni	192
	Campioni positivi	191
	Sensibilità in %	99%
Tutti i dischetti contaminati con Salmonella	N° di campioni	384
	Campioni positivi	382
	Sensibilità in %	99%
Tutti i dischetti	N° di campioni	480
	Campioni corretti	477
	Accuratezza in %	99%

Tab. 7 Valori di specificità, sensibilità e accuratezza complessivi ottenuti valutando le performance ottenute dei laboratori partecipanti (32) sui campioni artificialmente contaminati con feci negative per *Salmonella* spp.

6.4 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 4 e 5).

Tutti i laboratori hanno soddisfatto i criteri minimi di buona performance.

REPORT DEFINITIVO

X Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2017:

Isolamento *Salmonella* spp. da campioni di origine animale produzione primaria

7. Conclusioni

Il livello di sensibilità e specificità è risultato per questa edizione del circuito nel complesso molto elevato.

Tutti i laboratori hanno raggiunto un ottimo livello di performance.

Ciononostante si evidenzia che diversi laboratori hanno dichiarato tempi dedicati alla fase di pre-arricchimento diversi rispetto a quanto previsto dalla metodica di riferimento. Si raccomanda quindi di prestare attenzione per il futuro a questo aspetto.

Nessun laboratorio ha segnalato criticità rispetto allo stato del materiale di riferimento.

I risultati del presente circuito hanno una validità pari a 3 anni.

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 dr.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).**

Il presente report è a cura di

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

Responsabile circuito interlaboratorio

Dr.ssa Antonia Ricci

Responsabile schema isolamento-identificazione

Dr.ssa Veronica Cibir

Tel.0498084163 e-mail circuitisalmisolamento@izsvenezie.it

Responsabile tecnico

Dr.ssa Cristina Saccardin

Tel. 049 8084283 e-mail circuitisalmisolamento@izsvenezie.it

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi
V.le dell’Università 10-35020 LEGNARO (PD)
www.izsvenezie.it

Report definitivo 01.03.2018

REPORT DEFINITIVO

X Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2017:

Isolamento *Salmonella* spp. da campioni di origine animale produzione primaria

INDICAZIONI GENERALI

CIRCUITO INTERLABORATORIO X (2017)

ISOLAMENTO DI *SALMONELLA* SPP.

Organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi

Il presente circuito interlaboratorio relativo all'isolamento di *Salmonella* spp. è 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 prelevati nell'ambito della produzione primaria.

La metodica di riferimento da utilizzarsi nell'ambito di questo studio è quella riportata nella ISO 6579-1:2017 (escluso Annex D) con particolare riferimento alla procedura prevista per i campioni prelevati nell'ambito della produzione primaria.

Per quanto riguarda i campioni da sottoporre ad indagine verrà utilizzato materiale di riferimento certificato e feci di pollo negative per *Salmonella* spp.

Il materiale di riferimento consiste di dischetti contenenti quantità standard e note del medesimo sierotipo di *Salmonella* spp. e dischetti "bianchi" ovvero non contenenti alcun microorganismo.

Ciascun laboratorio esaminerà 15 campioni di feci (10 grammi ciascuno) addizionati con un dischetto contenente *Salmonella* o non contenente alcun microorganismo e 3 controlli, come riportato in dettaglio nella Procedura Operativa.

Il materiale verrà confezionato in un pacco contenente 2 diversi sacchetti, uno con il materiale di riferimento (dischetti, contenuti in vials numerate da 1 a 15 più una siglata "C1", da conservare a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$), l'altro con le feci negative per *Salmonella* spp. (circa 200 grammi, da conservare a $+4^\circ\text{C}$).

Il laboratorio ricevente dovrà segnalare al più presto eventuali problemi riscontrati all'apertura delle confezioni (e-mail: circuitisalmisolamento@izsvenezie.it).

Il materiale verrà inviato tramite corriere che provvederà a mantenere il materiale a temperature di refrigerazione. Ciascun laboratorio partecipante dovrà contattare urgentemente il CRNS (e-mail: circuitisalmisolamento@izsvenezie.it) in caso di mancato recapito entro 3 giorni lavorativi dalla data di spedizione prevista.

Lo studio verrà effettuato contemporaneamente da tutti i laboratori coinvolti nel corso della settimana dal 20 al 24 novembre 2017.

I documenti utili per partecipare allo studio sono i seguenti:

- Indicazioni generali del Circuito Interlaboratorio per l'Isolamento di *Salmonella* spp.
- Procedura operativa (PO) del Circuito Interlaboratorio per l'Isolamento di *Salmonella* spp.
- Pianificazione delle attività.

Tutti gli esiti dovranno essere riportati nel Test Report presente nella piattaforma AQUAWEB secondo il calendario previsto dal CRNS, che valuterà i risultati e provvederà a pubblicare un report parziale (con descrizione dei risultati attesi) ed un report definitivo comprensivo della valutazione della performance e delle eventuali criticità riscontrate.

Le comunicazioni relative al circuito da parte del CRNS verranno gestite attraverso la piattaforma Aquaweb utilizzando gli indirizzi e-mail registrati dagli utenti.

I documenti saranno pubblicati in Aquaweb ed accessibili accedendo alla piattaforma utilizzando le credenziali di accesso rilasciate.

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

PROCEDURA OPERATIVA (PO)

CIRCUITO INTERLABORATORIO X (2017) ISOLAMENTO DI *SALMONELLA* SPP.

Organizzato dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi

1. Scopo e campo di applicazione

Questo documento (PO) descrive la procedura per l'identificazione di *Salmonella* limitatamente al presente Circuito Interlaboratorio.

L'obiettivo principale dello studio è di valutare la capacità, da parte dei laboratori partecipanti, di isolare *Salmonella* spp. in matrici quali feci di origine animale e campioni ambientali prelevati a livello di produzione primaria.

Per la preparazione dei campioni da sottoporre ad indagine è utilizzato materiale di riferimento certificato che consiste in dischetti contenenti concentrazioni note di un sierotipo noto di *Salmonella* spp. e in dischetti "bianchi" ovvero non contenenti alcun microrganismo; inoltre è utilizzato materiale fecale di origine avicola negativo per *Salmonella* spp.

In particolare, per quanto riguarda il materiale di riferimento certificato (Vitroids™), questo viene distribuito da Sigma-Aldrich (per maggiori dettagli: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/microbiology/microbiology-products.html?TablePage=108303480>). Tale materiale è particolarmente stabile anche agli eventuali sbalzi di temperatura.

Ai laboratori è richiesto di allestire i campioni di prova provvedendo a contaminare le feci negative per *Salmonella* spp. con i dischetti.

2. Riferimenti bibliografici e normativi

- ISO 6579-1 (2017) " Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*, Part 1: Detection of *Salmonella* spp."
- Regolamento (EC) N°2160/2003 sul controllo della salmonella e altri agenti zoonotici specifici e successive modifiche ed integrazioni.

3. Definizioni

Ai fini della presente PO si forniscono 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

Il metodo da utilizzarsi è quello descritto nella ISO 6579-1:2017 (escluso Annex D). Oltre a questo metodo è possibile utilizzare metodi alternativi, avendo cura di riportare le informazioni richieste nel Test Report.

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 Salmonella

MSRV Modified Semi-solid Rappaport Vassiliadis medium

XLD Xylose Lysine Deoxycholate Agar

NA Nutrient Agar

TSI Triple Sugar Iron Agar

LISINA Lysine Decarboxylation medium

UA Urea Agar

6. Terreni/Soluzioni/Reagenti

I terreni/kit e reagenti necessari ai fini dello studio NON verranno forniti dal CRNS.

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

APTS

MSRV

XLD (obbligatorio) + un secondo terreno di isolamento selettivo a scelta (obbligatorio)

NA (facoltativo)

TSI agar

UREA

LISINA

AGAR TRIPTOSIO

Kit commerciale di identificazione biochimica (in alternativa ai test biochimici in macrometodo)

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)

6.3 Terreni di isolamento selettivo differenziale

- Xylose-Lysine-Deoxycholate (XLD)
- Secondo terreno di isolamento selettivo comunemente utilizzato presso il laboratorio (obbligatorio)

6.4 Conferma isolamento (facoltativo)

- Nutrient Agar (NA)

6.5 Prove Biochimiche

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

- TSI
- UA
- Lisina
- TTM (reazione indolo con reattivo di Kovacs)
- ONPG

In alternativa è possibile utilizzare Kit commerciali di identificazione biochimica.

Altre prove sono da considerarsi facoltative.

7. Conferma Sierologica

Eeguire la conferma sierologica attraverso agglutinazione dei ceppi isolati con sieri polivalenti (poli-O e poli-H).

8. Procedura

8.1 Indicazioni di carattere generale

Di seguito vengono descritte in dettaglio le modalità di allestimento dei campioni di prova (campioni e controlli).

Per la procedura di analisi si rimanda a quanto riportato nella ISO 6579-1:2017 (escluso Annex D).

Pre-arricchimento (giorno 1)

➤ Preparazione campioni

Preparare 15 sacchetti sterili (siglare da 1 a 15) o altro contenitore sterile, con 90 ml di APTS a temperatura ambiente .

➤ Preparazione controlli

Preparare 3 sacchetti sterili, o altro contenitore (siglare da C1 a C3) con 90 ml di APTS a temperatura ambiente.

➤ Fase di contaminazione

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

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

I dischetti si dissolvono completamente molto rapidamente. Eventuali anomalie in questa fase vanno segnalate nel Test Report.

➤ Fase aggiunta matrice

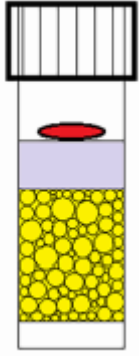
Aggiungere 10 g di feci a tutti i contenitori (incluso il C3) **tranne che a quelli siglati C1 e C2.**

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

! Non aggiungere feci ai sacchetti C1, C2.

! Omogeneizzare delicatamente manualmente.

! I dischetti sono di colore rosso e dimensione estremamente ridotta, porre attenzione durante la manipolazione. Eventuali variazioni di colore dei dischetti non sono da considerarsi un difetto.



! Ai controlli C2 e C3 non andrà aggiunto alcun dischetto

Tabella riassuntiva allestimento campioni di prova:

Campione di prova	APTS 90 ml	DISCHETTO	FECI 10g
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
A8	SI	SI	SI
A9	SI	SI	SI
A10	SI	SI	SI
A11	SI	SI	SI
A12	SI	SI	SI
A13	SI	SI	SI
A14	SI	SI	SI
A15	SI	SI	SI
C1	SI	SI	NO
C2	SI	NO	NO
C3	SI	NO	SI

Procedere all'analisi dei campioni come indicato nella procedura di riferimento avendo cura di registrare ora e data di inizio/fine di ciascuna fase.

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.