

Anno 2018

**Risultati XI Circuito Interlaboratorio
Nazionale, Anno 2018:
Isolamento Salmonella spp. da campioni
di origine animale produzione primaria**

Sommario

1. INTRODUZIONE	2
2. LABORATORI PARTECIPANTI.....	2
3. MATERIALI E METODI	4
3.1 MATERIALE DI RIFERIMENTO	4
3.2 MATRICE	5
3.3 DOCUMENTI TRASMESSI AI LABORATORI PARTECIPANTI	7
4. ANALISI DEI DATI.....	7
5. CRITERI PER LA DEFINIZIONE DI “BUONA PERFORMANCE”.....	7
6. RISULTATI.....	8
6.1 VALUTAZIONE DATI TECNICI	8
6.2 CAMPIONI CONTROLLO	10
6.3 CAMPIONI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI	10
6.4 VALUTAZIONE DELLA PERFORMANCE DEI LABORATORI PARTECIPANTI.....	11
7. CONCLUSIONI	11

Indice tabelle

TABELLA 1 ELENCO DEI LABORATORI ISCRITTI AL CIRCUITO.	3
TABELLA 2 CALENDARIO DELLE ATTIVITÀ	4
TABELLA 3 TIPO E NUMERO DI DISCHETTI TESTATI DAI LABORATORI PARTECIPANTI.	6
TABELLA 4 CRITERI DI CONFORMITÀ PER CAMPIONI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI CON DISCHETTO CONTENENTE UN LIVELLO NOTO DI SALMONELLA TYPHIMURIUM (STM)	8
TABELLA 5 CRITERI DI CONFORMITÀ PER CAMPIONI E CONTROLLI NON CONTAMINATI.....	8
TABELLA 6 LABORATORI CHE HANNO REGISTRATO TEMPI E/O TEMPERATURE D’INCUBAZIONE DELLA FASE DI PRE-ARRICCHIMENTO CHE SI DISCOSTANO DAL METODO DI RIFERIMENTO.	9
TABELLA 7 VALORI DI SPECIFICITÀ, SENSIBILITÀ E ACCURATEZZA COMPLESSIVI OTTENUTI VALUTANDO LE PERFORMANCE OTTENUTE DEI LABORATORI PARTECIPANTI (33) SUI CAMPIONI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI CON FECI NEGATIVE PER SALMONELLA SPP. .	11

REPORT DEFINITIVO

XI Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2018:

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 l'undicesimo 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 (IZZSS) ed è stato gestito attraverso la piattaforma AQUAWEB dell'IZS Venezie.

2. Laboratori partecipanti

Al presente circuito si sono iscritti 33 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.

LABORATORIO	REFERENTE
IZS ABRUZZO E MOLISE - SEZIONE DIAGNOSTICA DI AVEZZANO (AQ)	DI VENTURA MAURO
IZS ABRUZZO E MOLISE - SEZIONE DI CAMPOBASSO	MARINO LUCIO
IZS ABRUZZO E MOLISE - SEZIONE DIAGNOSTICA DI LANCIANO (CH)	MORELLI DANIELA
IZS ABRUZZO E MOLISE - ISTITUTO G. CAPORALE	PETRINI ANTONIO
IZS ABRUZZO E MOLISE - SEZIONE DIAGNOSTICA DI PESCARA	MORELLIDANIELA
IZS LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA - SEZIONE DI FERRARA	RUBINI SILVA
IZS LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA- SEZIONE DI RAVENNA (LUGO)	RAFFINI ELISABETTA
IZS LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA - SEZIONE DIAGNOSTICA DI BERGAMO	PATERLINI FRANCO
IZS LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA - SEZIONE DIAGNOSTICA DI LODI	LUINI MARIO
IZS LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA - SEZIONE DIAGNOSTICA DI PAVIA, LABORATORIO DI SIEROLOGIA	PRATI PAOLA
IZS DEL MEZZOGIORNO - SEZIONE DI SALERNO	DE CARLO ESTERINA
IZS DEL MEZZOGIORNO - SEDE DI CATANZARO LABORATORIO ALIMENTI/CONTROLLO QUALITÀ	CASALINUOVO
IZS DEL MEZZOGIORNO - SEZIONE DIAGNOSTICA DI AVELLINO	MARIANI UGO
IZS PIEMONTE LIGURIA E VALLE D'AOSTA - SEZIONE CUNEO	PISTONE GIANCARLO
IZS PIEMONTE LIGURIA E VALLE D'AOSTA - SEZIONE DI SAVONA	AROSSA CLAUDIO
IZS PIEMONTE LIGURIA E VALLE D'AOSTA - SEZIONE DI ASTI E CENTRO APISTICO REGIONALE	MOGLIOTTI PAOLA
IZS PUGLIA E BASILICATA - S.C. DIAGNOSTICA	TROIANO PASQUALE
IZS PUGLIA E BASILICATA - S.C.T. DI MATERA	SANTAGADA
IZS PUGLIA E BASILICATA - SEDE DI PUTIGNANO (BARI)	MONTAGNA COSIMO
IZS SICILIA - AREA DI RAGUSA	CASCONI GIUSEPPE
IZS SICILIA - AREA CATANIA	MARINO A.M.F.
IZS SICILIA - A.A.T.I.	VICARI DOMENICO
IZS SICILIA- AREA TERRITORIALE DI CALTANISSETTA LAB. ATTIVITÀ ASSISTENZA TERRITORIALE INTERPROVINCIALE	CAMPO FRANCESCO
IZS SICILIA - AREA DI BRCELLONA P.G. LABORATORIO DI ASSISTENZA TERITORIALE	PRESTI
IZS UMBRIA E MARCHE - PERUGIA LABORATORIO DIAGNOSTICA	PAPA PAOLA
IZS UMBRIA E MARCHE - SEZIONE DI TOLENTINO (MC)	PERUGINI GIANNI
IZS VENEZIE - SCT1 VERONA LAB CONTROLLO UFFICIALE ALIMENTI	MULIARI RICCARDO
IZS VENEZIE - SCT2 TREVISO	AGNOLETTI FABRIZIO
IZS VENEZIE - SCT4 UDINE	VIO DENIS
IZS VENEZIE - SCT6 BOLZANO LAB CONTROLLO UFFICIALE ALIMENTI	LOMBARDO DOROTEA
IZS VENEZIE - SCT3- PADOVA E ROVIGO LABORATORIO DIAGNOSTICA CLINICA	SCHIAVON ELIANA
IZS VENEZIE - SCT4 PORDENONE	VIO DENIS
IZS VENEZIE - SCT5 TRENTO LAB CONTROLLO UFFICIALE ALIMENTI E LAB AUTOCONTROLLO	FARINA GIOVANNI

Tabella 1 Elenco dei Laboratori iscritti al Circuito.

REPORT DEFINITIVO

XI Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2018:

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 XI Circuito Interlaboratorio Isolamento SA4 2018	
Scadenze	Azioni
Entro 31/10/18	Pubblicazione protocollo delle modalità operative. <i>Si ricorda che ciascun laboratorio dovrà procedere a procurarsi il materiale necessario, come indicato nel protocollo.</i>
Dal 12/11/18 Al 16/11/18	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 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. A mancata ricezione seguirà immediata comunicazione al CRNS via e-mail (circuitisalmisolamento@izsvenezie.it)
Dal 19/11/18 Al 23/11/18	Effettuazione del circuito
Entro 06/12/18	Inserimento dei dati (risultati) nel Test Report presente in AQUAWEB. <i>Non sarà possibile inserire risultati oltre la data indicata, inoltre risultati inviati con altre modalità non verranno presi in considerazione</i>
Entro 13/12/19	Pubblicazione in AQUAWEB del report parziale con indicazione del risultato atteso

Tabella 2 Calendario delle attività

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 (Vitroids™), commercializzato dalla ditta SIGMA-ALDRICH S.r.l. Nello specifico sono stati impiegati

REPORT DEFINITIVO

XI Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2018:

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

dischetti “bianchi” (non contenenti alcun microrganismo) e dischetti contenenti 15-80 ufc di *Salmonella Typhimurium* (STM) (Product no VT000312, Lot no BCBW2932).

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 A9 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, da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp. A1, A2, A3, A5, A7, A8;
- 4 dischetti “bianchi” non contenenti *Salmonella* spp. (3 da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp. A4, A6, A9 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.

REPORT DEFINITIVO

XI Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2018:

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

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: $13 \cdot 10^8$ ufc/g (carica mesofila totale) e $62 \cdot 10^3$ 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);
- 9 dischetti numerati da 1 a 9 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=9)
<i>S. Typhimurium</i> (STM)	0	6
Bianco	1	3

Tabella 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:

- Procedura operativa (PO) del Circuito Interlaboratorio per l'isolamento di *Salmonella* spp. (Allegato 1) 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 STM. Si è considerato accettabile un numero di errori

paria a 1; 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
STM	~83%	5/6

Tabella 4 Criteri di conformità per campioni artificialmente contaminati con dischetto contenente un livello noto di *Salmonella* Typhimurium (STM)

	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***

Tabella 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).

Tre 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.

REPORT DEFINITIVO

XI Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2018:

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

Per quanto riguarda il secondo terreno selettivo-differenziale, BGA è stato utilizzato da 19 laboratori, Rambach da 8 laboratori, BSA da 3 laboratori, 2 laboratori hanno utilizzato un terreno cromogenico per Salmonella ed infine 1 laboratorio ha utilizzato oltre che ad un secondo terreno selettivo differenziale (BGA) anche un terzo terreno (Hektoen Enteric Agar).

Per quanto riguarda le prove biochimiche: 2 laboratori hanno utilizzato esclusivamente i test in macrometodo; 10 laboratori effettuato le prove biochimiche in macrometodo ma hanno anche utilizzato un kit commerciale; 21 laboratori hanno utilizzato esclusivamente un kit commerciale.

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 non sono state rilevate deviazioni rispetto al metodo di riferimento per quanto riguarda la temperatura, mentre per quanto riguarda il tempo di incubazione si segnala che il laboratorio L000383 ha riportato un tempo di incubazione rispettivamente pari a 28 ore e 20 ore in riferimento al primo e secondo periodo di incubazione ovvero non conferme rispetto a quanto previsto dal metodo di riferimento pari a 24 +/- 3 ore.

Si segnala inoltre che i laboratori L000673 e L000727 non hanno riportato informazioni per quanto riguarda il secondo periodo di incubazione per nessuno dei campioni.

Pre-arricchimento APTS	
Codice identificativo del laboratorio	Tempo di incubazione in ore
	16-20
L000342	20:30
L000359	24
L000360	17:30
L000362	23:45
L000460	24:30
L000638	23:45
L000761	24

Tabella 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 7 laboratori hanno utilizzato tempi di pre-arricchimento in APTS diversi rispetto a quanto previsto dalla procedura di riferimento.

In merito alla conferma sierologica i laboratori L000460, L000734, L000752, L000761 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" (A4; A6; A9) a cui sono state aggiunte le feci negative per *Salmonella* spp. sono stati identificati come negativi da tutti i partecipanti tranne che dal laboratorio L000332 che ha segnalato presenza di *Salmonella* spp. nel campione identificato A9.

Dischetti *Salmonella* Typhimurium (n=6)

Tutti i laboratori hanno fornito esito positivo per tutti i campioni contaminati con STM (A1; A2; A3; A5; A7; A8) tranne che il laboratorio L000332 che non ha identificato la presenza di di *Salmonella* spp. 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	99
	Campioni negativi	98
	Specificità in %	99%
STM (6 per lab)	N° di campioni	198
	Campioni positivi	197
	Sensibilità in %	99%
Tutti i dischetti	N° di campioni	297
	Campioni corretti	295
	Accuratezza in %	99%

Tabella 7 Valori di specificità, sensibilità e accuratezza complessivi ottenuti valutando le performance ottenute dei laboratori partecipanti (33) sui campioni artificialmente contaminati con feci negative per *Salmonella* spp.

6.4 Valutazione della performance dei laboratori partecipanti

Tutti i laboratori hanno soddisfatto i criteri minimi di buona performance così come definiti nelle tabelle 4 e 5.

7. Conclusioni

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

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

Ciononostante si evidenzia che in alcuni casi si sono rilevate delle deviazioni rispetto alla metodica di riferimento, per cui si raccomanda di prestare attenzione per il futuro.

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

I risultati del presente circuito rimangono validi fino al 31 dicembre del terzo anno a partire dall'anno di partecipazione, ovvero fino al 31 dicembre 2021.

Il presente report viene pubblicato **nel gestionale AQUAWEB** e nell'apposita **sezione pubblica del sito dell'IZSVe** (Home > Servizi > Altri servizi > Circuito interlaboratorio AQUA > Schemi e report 2018).

REPORT DEFINITIVO

XI Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2018:

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

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

Veronica Cibir, Paola Pestelli, Cristina Saccardin..

Responsabile circuito interlaboratorio

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 01.04.2019

REPORT DEFINITIVO

X Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2017:

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

PROCEDURA OPERATIVA (PO)

CIRCUITO INTERLABORATORIO XI (2018) 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.

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

Tali campioni corrispondono a quelli oggetto di prelievo nell'ambito del Piano Nazionale di Controllo delle Salmonellosi negli avicoli che devono essere analizzati, se prelevati dall'Autorità Competente ai fini di controllo ufficiale, utilizzando il metodo di cui alla ISO 6579-1:2017.

I laboratori dovranno utilizzare la suddetta metodica per l'analisi dei campioni; potranno altresì utilizzare metodiche alternative ma dovranno riportare nel test report solo i risultati ottenuti con il metodo di cui alla ISO 6579-1:2017.

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 (MRC-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)..

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/BPW

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/Buffered Peptone Water (APTS/BPW)

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

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 9 sacchetti sterili (siglare da 1 a 9) 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

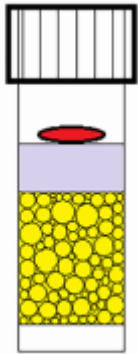
Aggiungere 10 g di feci a tutti i contenitori (incluso il C3) **tranne che a quelli siglati C1 e C2.**

! 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
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, oltre che all'esito ottenuto, anche eventuali ulteriori informazioni che si ritiene possano aver influenzato i risultati.