



Circuito interlaboratorio
per l'assicurazione qualità
dei risultati



Schema di isolamento *Salmonella* spp. da campioni di
origine animale produzione primaria

Report Circuito AQUA SA 4-20

Sommario

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

Indice Tabelle

TAB. 1 - ELENCO DEI LABORATORI PARTECIPANTI AL CIRCUITO.....	3
TAB. 2 - CALENDARIO DELLE ATTIVITÀ	4
TAB. 3 - TIPO E NUMERO DI DISCHETTI TESTATI DAI LABORATORI PARTECIPANTI.	6
TAB. 4 - CRITERI DI CONFORMITÀ PER CAMPIONI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI CON DISCHETTO CONTENENTE UN LIVELLO NOTO DI SALMONELLA TYPHIMURIUM (STM)	7
TAB. 5 - CRITERI DI CONFORMITÀ PER CAMPIONI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATI CON DISCHETTO NON CONTENENTE ALCUN MICRORGANISMO	7
TAB. 6 - CRITERI DI CONFORMITÀ PER CAMPIONI E CONTROLLI	7
TAB. 7 - LABORATORI CHE HANNO REGISTRATO TEMPI D’INCUBAZIONE DELLA FASE DI PRE-ARRICCHIMENTO CHE SI DISCOSTANO DAL METODO DI RIFERIMENTO.....	8

REPORT DEFINITIVO

XIII Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2020:

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

1. Introduzione

Uno dei principali compiti dei Centri di Referenza Comunitari e Nazionali 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 ha previsto l'esclusiva partecipazione dei laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) ed è stato gestito attraverso la piattaforma AQUAWEB dell'IZS Venezie.

REPORT DEFINITIVO

XIII Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2020:

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

2. Laboratori partecipanti

Al presente circuito si sono iscritti 31 laboratori afferenti agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

Dopo l'iscrizione 3 laboratori hanno comunicato la loro impossibilità a partecipare in considerazione dell'aggravarsi della situazione emergenziale Covid-19.

Di seguito viene riportata la lista dei 28 laboratori partecipanti (e relativi referenti), ciascuno dei quali è stato identificato con un codice numerico assegnato arbitrariamente.

DESCRIZIONE_LABORATORIO	RESPONSABILE_LABORATORIO
ISZ SICILIA -A.A.T.I.	DOMENICO VICARI
ISZAM "G. CAPORALE" - SEZIONE DIAGNOSTICA DI AVEZZANO (AQ)	STEFANIA SALUCCI
IZS DEL MEZZOGIORNO - CATANZARO UOS DIAGNOSTICA	CATERINA RIVERSO
IZS DEL MEZZOGIORNO SEZIONE DI SALERNO	ESTERINA DE CARLO
IZS MEZZOGIORNO - LABORATORIO DI DIAGNOSTICA, SEZIONE DI CASERTA	ANTONELLA PESCE
IZS SICILIA - AREA CATANIA	A.M.F. MARINO
IZS SICILIA - MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI - AREA BARCELLONA P.G.	MICHELE FIASCONARO
IZS SICILIA "A. MIRRI" - AREA DI RAGUSA	GIUSEPPE CASCONI
IZSAM "G. CAPORALE"	ANTONIO PETRINI
IZSAM "G. CAPORALE" - SEZIONE DIAGNOSTICA DI PESCARA	FABRIZIO DE MASSIS
IZSLER - SEDE TERRITORIALE DI PARMA	ANDREA LUPPI
IZSLER - SEZIONE DI MODENA	GIANLUCA RUGNA
IZSLER - SEZIONE DIAGNOSTICA BRESCIA	ALBORALI LORIS
IZSLER - SEZIONE DIAGNOSTICA DI BINAGO	CRISTINA SACCHI
IZSLER - SEZIONE DIAGNOSTICA DI MANTOVA	CARLO ROSIGNOLI
IZSLER - SEZIONE DIAGNOSTICA DI SONDRIO	IRENE BERTOLETTI
IZSLT - DIREZIONE OPERATIVA DIAGNOSTICA GENERALE	ANTONIO BATTISTI
IZSM PORTICI - U.O. DIAGNOSTICA GENERALE	ANNA CERRONE
IZSPB - S.C. DIAGNOSTICA	PASQUALE TROIANO
IZSPB - S.C.T. DI MATERA	GIANFRANCO SANTAGADA
IZSPB - SEDE DI PUTIGNANO (BARI)	COSIMO MONTAGNA
IZSPLVA - S.S. CUNEO	PIER GIUSEPPE BIOLATTI
IZSPLVA - SEZIONE DI ASTI E CENTRO APISTICO REGIONALE	PAOLA MOGLIOTTI
IZSPLVA - SEZIONE DI SAVONA	CLAUDIO AROSSA
IZSVE - LABORATORIO SCT6BZ	MICHELA RABINI
IZSVE - SCT3 PADOVA E ROVIGO LABORATORIO DIAGNOSTICA CLINICA	ELIANA SCHIAVON
IZSVE - SEZIONE TERRITORIALE DI VERONA LABORATORIO CONTROLLO ALIMENTI	RICCARDO MULIARI
IZSVE - TREVISO	LUCA BANO

Tab. 1 - Elenco dei Laboratori partecipanti al Circuito.

REPORT DEFINITIVO

XIII Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2020:

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).

Scadenze	Azioni
Entro 26/10/2020	Pubblicazione protocollo delle modalità operative.
Dal 16/11/20 Al 20/11/20	Spedizione del materiale ai laboratori coinvolti tramite corriere.
Dal 23/11/20 Al 27/11/20	Effettuazione del circuito
Entro 14/12/2020	Inserimento dei dati (risultati) nel Test Report presente in AQUAWEB .
Entro 21/12/2020	Pubblicazione in AQUAWEB del report parziale con indicazione del risultato atteso

Tab. 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/Amd 1:2020.

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) e dischetti contenenti *Salmonella* Typhimurium (STM); in particolar per allestimento dei campioni "A" e C1 è stato utilizzato il prodotto n. VT000313 (80-130 ufc) lotto BCCB1247.

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 (vials 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 codice C1 e C2 le provette con il dischetto da impiegare per allestire i controlli da analizzare in assenza di matrice .

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

- 5 dischetti contenenti STM, di cui 4 da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp. ed 1 da aggiungere al controllo C1;

REPORT DEFINITIVO

XIII Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2020:

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

- 4 dischetti "bianchi" non contenenti *Salmonella* spp. di cui 3 da aggiungere ai campioni di feci di origine animale negativi per *Salmonella* spp. e 1 da aggiungere al controllo C2;

Ai laboratori esecutori è stata data indicazione di allestire in autonomia i controlli di processo rispettivamente: C3 "controllo matrice", da allestire con la matrice feci e APTS (senza aggiunta di dischetto) ed il controllo C4 con solo APTS in assenza di matrice feci (senza aggiunta di dischetto).

Ai laboratori partecipanti sono state somministrate diverse distribuzioni (5 differenti) intese come serie di campioni a cui è stato attribuito un ordine diverso dei campioni "A" pur mantenendo uguale nel complesso il numero di campioni allestiti con dischetti bianchi e dischetti STM.

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 (25g di matrice ciascuno).

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. Da ciascuna aliquota sono stati prelevati 25 g di campione e si è proceduto alla ricerca di *Salmonella* spp. secondo la metodica definita nel documento UNI EN ISO 6579-1:2017.

Le analisi effettuate hanno confermato l'assenza di *Salmonella* spp. in tutte le aliquote testate.

Inoltre, sul materiale fecale, al momento dell'arrivo presso il CRNS, sono stati eseguiti due controlli, relativi alla quantificazione della Carica Mesofila Totale (procedura UNI EN ISO 4833-2_2013) e degli Enterobatteri (procedura UNI EN ISO 21528-2_2017).

I risultati delle analisi sono i seguenti: $9,5 \times 10^8$ ufc/g (carica mesofila totale) e $2,3 \times 10^7$ ufc/g (*Enterobacteriaceae*).

Le informazioni relative alle prove di omogeneità sono disponibili, su richiesta, presso l'organizzatore. 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 STM "controllo" (da testare senza aggiunta di feci);
- 1 dischetto C2 bianco "controllo" (da testare senza aggiunta di feci);
- 7 dischetti numerati da 1 a 7 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.

REPORT DEFINITIVO

XIII Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2020:

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

Dischetti	Dischetti controllo (n=1)	Dischetti campione (n=7)
S. Typhimurium (STM)	1	4
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 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 4 campioni prova il primo giorno previsto per l'esecuzione del circuito e i rimanenti 5 l'ultimo giorno (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 le informazioni trasmesse mediante i test report dai partecipanti, al fine di evidenziare eventuali anomalie nell'esecuzione del protocollo.

REPORT DEFINITIVO

XIII Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2020:

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

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 pari a 1 per quanto riguarda i campioni contaminati con dischetti bianchi, poiché non può esserci la totale 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 (stessa tolleranza è applicata al controllo C3). Per quanto riguarda il controllo C1 si è applicata una tolleranza pari a 0.

	Risultati minimi	
CAMPIONI	% positivi	N° test corretti/ N° totale di campioni
STM	75%	3/4

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

	Risultati minimi	
CAMPIONI	% positivi	N° test corretti/ N° totale di campioni
Bianchi	~66%	2/3

Tab. 5 - Criteri di conformità per campioni artificialmente contaminati con dischetto non contenente alcun microrganismo

	Limiti di accettabilità	
CONTROLLI	% positivi	N° test corretti N° totale di controlli
Bianchi	~33%**	1/3*
STM	100%	1/1

Tab. 6 - Criteri di conformità per campioni e controlli

*sono considerati sia il controllo C2 (dischetto bianco + APTS) che i controlli C3 (feci +APTS) e C4 (APTS).

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

REPORT DEFINITIVO

XIII Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2020:

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

6. Risultati

6.1 Valutazione dati tecnici

Tutti i laboratori hanno utilizzato il metodo descritto nella ISO 6579-1:2017 (escluso Annex D). Un laboratorio (L000375) ha utilizzato anche un metodo alternativo.

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 17 laboratori, Rambach da 6 laboratori, BSA da 3 laboratori, infine 1 laboratorio ha utilizzato un terreno cromogenico per Salmonella ed 1 laboratorio ha utilizzato SS.

Per quanto riguarda le prove biochimiche: 3 laboratori hanno utilizzato esclusivamente i test in macrometodo; 11 laboratori hanno effettuato le prove biochimiche in macrometodo ma hanno anche utilizzato un kit commerciale; 14 laboratori hanno utilizzato esclusivamente un kit commerciale.

Di seguito (Tabella 7) 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 sia per quanto riguarda la temperatura che per quanto riguarda il tempo.

Pre-arricchimento APTS	
Codice identificativo laboratorio	Tempo di incubazione in ore
L000359	24
L000362	22
L000432	25
L000460	23
L000503	22
L000662	22
L000671	24
L000686	24

Tab. 7 - Laboratori che hanno registrato tempi 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.

In merito alla conferma sierologica, per quattro laboratori (L000362; L000375; L000460; L000671) non risulta essere stata effettuata.

REPORT DEFINITIVO

XIII Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2020:

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

6.2 Campioni controllo “C”

Tutti i laboratori hanno identificato correttamente i controlli da C1 a C4.

6.3 Campioni artificialmente contaminati “A”

Dischetti bianchi (n=3)

I tre campioni con “dischetti bianchi” a cui sono state aggiunte le feci negative per *Salmonella* spp. sono stati identificati come negativi da tutti i partecipanti.

Dischetti *Salmonella* Typhimurium (n=4)

Tutti i laboratori hanno fornito esito positivo per tutti i campioni contaminati con STM.

In sintesi tutti i laboratori hanno identificato correttamente sia i controlli che i campioni, di conseguenza sensibilità, specificità e accuratezza risultano pari al 100%.

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, 5 e 6.

7. Conclusioni

Questa edizione del circuito ha registrato un livello di performance eccellente da parte di tutti i laboratori partecipanti.

Da evidenziare che i laboratori che hanno utilizzato anche un metodo alternativo hanno ottenuto con i due metodi risultati sovrapponibili e che nessuno dei metodi alternativi utilizzati corrisponde a metodi basati su tecniche di biologia molecolare.

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 2023.

Si richiede ai laboratori di iscriversi al circuito sulla base di una propria pianificazione pluriennale in accordo a quanto previsto dal Documento RT 24 di Accredia “PROVE VALUTATIVE” consentendo in questo modo al CRNS di gestire il circuito nelle migliori condizioni possibili e ponendo le condizioni affinché venga garantita la regolare partecipazione di tutti i laboratori degli IZZSS richiedenti.

Per lo stesso motivo si sottolinea che in caso di condizioni reiterate di iscrizioni al circuito (con invio del materiale da parte del CRNS) associate a mancata partecipazione, verranno considerate motivo di esclusione di partecipazione ad edizioni successive dello stesso nel caso di numero di iscrizioni superiori alle capacità gestionali da parte del CRNS.

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 2020).

REPORT DEFINITIVO

XIII Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2020:

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

Lisa Barco, Paola Pestelli, Marta Leati, Cristina Saccardin.

Responsabile circuito interlaboratorio

Dr.ssa Barco Lisa

Tel.0498084137

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 26.03.2021

REPORT DEFINITIVO

XIII Circuito Interlaboratorio Nazionale, Anno 2020:

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

PROCEDURA OPERATIVA (PO)

CIRCUITO INTERLABORATORIO XIII (2020) 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/Amd1:2020**.

I laboratori dovranno utilizzare la suddetta metodica per l'analisi dei campioni e riportare nel test i risultati ottenuti.

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/Amd1:2020**

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/Amd1:2020**.

Pre-arricchimento (giorno 1)

Ciascun laboratorio esaminerà 11 campioni di cui 7 campioni di prova identificati da A1 ad A7 e 4 controlli identificati da C1 a C4.

La preparazione dei campioni da **A1** ad **A7** prevede dapprima l'allestimento dei contenitori siglati con APTS, successivamente l'aggiunta del dischetto ed infine l'aggiunta di 10 grammi di matrice ottenuti dal sacchetto 2.

I controlli comprendono: 2 controlli, **C1** e **C2**, da allestire aggiungendo all'APTS con dischetto; un controllo, **C3**, definito come "controllo matrice", da allestire aggiungendo all'APTS solo la matrice feci (senza aggiunta di dischetto) ed il controllo, **C4**, che consiste solo nell'APTS.

➤ 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

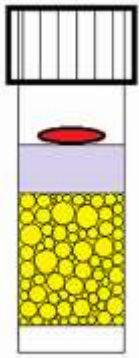
Aggiungere 10 g di feci a tutti i contenitori (incluso il C3) **tranne che a quelli siglati C1 e C2.**

! 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.



! Al controllo 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
C1	SI	SI	NO
C2	SI	SI	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.