



Circuito interlaboratorio  
per l'assicurazione qualità  
dei risultati



## XIV Report Circuito Interlaboratorio Nazionale

**SA4** - Isolamento *Salmonella* spp. da campioni di origine animale, produzione primaria

IIZZSS

Errata corrige

## Sommario

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>2</b>
<b>2. LABORATORI PARTECIPANTI</b> .....	<b>2</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>3</b>
3.1 MATERIALE DI RIFERIMENTO .....	3
3.2 MATRICE .....	4
3.4 DOCUMENTI TRASMESSI AI LABORATORI PARTECIPANTI .....	5
<b>4. ANALISI DEI DATI</b> .....	<b>5</b>
<b>5. CRITERI PER LA DEFINIZIONE DI “BUONA PERFORMANCE”</b> .....	<b>6</b>
<b>6. RISULTATI</b> .....	<b>8</b>
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
<b>7. CONCLUSIONI</b> .....	<b>9</b>

## Indice Tabelle

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

## 1. INTRODUZIONE

Uno dei principali compiti dei Centri di Referenza Comunitari e Nazionali è l'organizzazione di 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 che svolgono controlli ufficiali degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) ed è stato gestito attraverso la piattaforma AQUAWEB dell'IZS Venezia.

## 2. LABORATORI PARTECIPANTI

Al presente circuito si sono iscritti 29 laboratori afferenti agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

Di seguito viene riportato l'elenco dei 29 laboratori partecipanti (e relativi referenti), ciascuno dei quali è stato identificato con un codice numerico assegnato arbitrariamente.

IIZZSS	SEDI	IIZZSS	SEDI
IZS SICILIA	BARCELLONA P.G	IZS PUGLIA BASILICATA	BARI
	CALTANISSETTA		BRINDISI
	CATANIA		TARANTO
IZS MEZZOGIORNO	SEDE CENTRALE PORTICI - NAPOLI	IZS UMBRIA MARCHE	PERUGIA
	AVELLINO		TOLENTINO
	CASERTA	IZS SARDEGNA	SASSARI
	CATANZARO		BOLZANO
	COSENZA		PADOVA ROVIGO
IZS ABRUZZO MOLISE	CAMPOBASSO	IZS VENEZIE	PORDENONE
	PESCARA		TREVISO
IZS LOMBARDIA EMILIA ROMAGNA	BERGAMO		TRENTO
	BOLOGNA		UDINE
	FERRARA		VERONA
	PAVIA		

Tab. 1 - Elenco dei Laboratori partecipanti al Circuito.

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 25/10/2021	Pubblicazione protocollo delle modalità operative
Dal 15/11/2021 Al 19/11/2021	Spedizione del materiale ai laboratori coinvolti tramite corriere
Dal 22/11/2021 Al 26/11/2021	Effettuazione del circuito
Entro 03/12/2021	Inserimento dei dati (risultati) nel Test Report presente in AQUAWEB
Entro 20/12/2021	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 (Vitroids™), commercializzato dalla ditta SIGMA-ALDRICH S.r.l. Nello specifico sono stati impiegati dischetti (vitroids) "bianchi" (non contenenti alcun microrganismo) e dischetti (vitroids) contenenti *Salmonella* Typhimurium (STM).

**Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium WDCM 00031 VT000313**  
**Lot. n.: BCCC5872 (range di valore medio 80-130 CFU)**

**Blank 0 CFU RQC0001 Lot. n.:BCCF9028**

I certificati di analisi dei MRC sono disponibili presso l'organizzatore.

Una volta ricevuto il materiale di riferimento il CRNS ha provveduto a conservarlo alla temperatura compresa tra  $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , 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 utilizzare al controllo C1;
- 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 ( $-24^{\circ}\text{C} \pm 6^{\circ}\text{C}$ .) 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 ISO 6579-1:2017/Amd1:2020.

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:  $3,5 \times 10^8$  ufc/g (carica mesofila totale) e  $1,6 \times 10^7$  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 ( $-24 \pm 6^{\circ}\text{C}$ .) 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.

Dischetti	Dischetti controllo (n=2)	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, di cui ai punti precedenti, è stato inviato secondo la classificazione BIOL.SUB.CAT.B UN 3373, garantendo il mantenimento alla temperatura di -20°C.

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).

I campioni prova sono risultati omogenei e stabili in quanto concordi con il risultato atteso.

Le informazioni relative alle prove di negatività, di quantificazione della flora contaminante e di stabilità sono disponibili, su richiesta, presso l'organizzatore.

### 3.4 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 stata resa disponibile anche nella parte pubblica del sito [www.izsvenezie.it](http://www.izsvenezie.it).

## 4. ANALISI DEI DATI

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

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

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

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

Sono state inoltre sottoposte a verifica 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 e 5 vengono indicati i risultati minimi, in termini di risultati corretti, per quanto riguarda i campioni contaminati rispettivamente con STM e con dischetto non contenente alcun microrganismo.

In tabella 6, sono descritti i limiti di accettabilità per i campioni controllo, 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'analita 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.

CAMPIONI	Risultati minimi	
	% 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)

CAMPIONI	Risultati minimi	
	% 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

CONTROLLI	Limiti di accettabilità	
	% 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)

In tabella 7 viene riportato l'elenco dei laboratori e relativo soddisfacimento dei criteri di accettabilità della performance.

CODICE LABORATORIO AQUAWEB	DISTRIBUZIONE	CONFORMITA' AI CRITERI DEFINITI PER I CONTROLLI	CONFORMITA' AI CRITERI DEFINITI PER I CAMPIONI POSITIVI	CONFORMITA' AI CRITERI DEFINITI PER I CAMPIONI NEGATIVI
L000332	1	OK	OK	OK
L000370	1	OK	OK	OK
L000392	1	OK	OK	OK
L000455	1	OK	OK	OK
L000499	1	OK	OK	OK
L000727	1	OK	OK	OK
L000342	2	OK	OK	OK
L000375	2	OK	OK	OK
L000432	2	OK	OK	OK
L000460	2	OK	OK	OK
L000504	2	OK	OK	OK
L000734	2	OK	OK	OK
L000348	3	OK	OK	OK
L000376	3	OK	OK	OK
L000437	3	OK	OK	OK
L000465	3	OK	OK	OK
L000638	3	OK	OK	OK
L000761	3	OK	OK	OK
L000352	4	OK	OK	OK
L000383	4	OK	OK	OK
L000440	4	OK	OK	OK
L000480	4	OK	OK	OK
L000557	4	OK	OK	OK
L000662	4	Non valutabile	Non valutabile	Non valutabile
L000359	5	OK	OK	OK
L000390	5	OK	OK	OK
L000449	5	OK	OK	OK
L000485	5	OK	OK	OK
L000673	5	OK	OK	OK

Tab. 7-Tabella riassuntiva delle distribuzioni e della valutazione della performance sulla base dei criteri di accettabilità.

## 6. RISULTATI

### 6.1 Valutazione dati tecnici

Tutti i laboratori hanno utilizzato il metodo descritto nella ISO 6579-1:2017/Amd1:2020.

Un laboratorio non ha trasmesso i risultati, pertanto la performance non è valutabile.

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, **Brilliant Green Agar** è stato utilizzato da 13 laboratori, **Rambach** da 5 laboratori, **Brilliance Salmonella Agar** da 6 laboratori, 2 laboratori hanno utilizzato un terreno **Cromogeno**, 1 laboratorio ha utilizzato **Salmonella Shigella Agar**. Inoltre 1 laboratorio ha riportato di aver utilizzato come secondo terreno selettivo differenziale il Triple Sugar Iron, sebbene non si tratti di terreno che non presenti tali caratteristiche.

Per quanto riguarda le prove biochimiche: 3 laboratori hanno utilizzato esclusivamente le prove biochimiche in macrometodo; 6 laboratori hanno effettuato le prove in macrometodo ma hanno anche utilizzato un kit commerciale; 19 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/Amd1:2020, in merito in particolare alla fase di pre-arricchimento non selettivo (APTS). In totale 8 laboratori hanno registrato tempi di pre-arricchimento in APTS diversi rispetto a quanto previsto dalla procedura di riferimento.

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
L000375	24
L000376	24
L000460	24
L000480	23.30
L000504	21
L000638	24
L000761	21.30

Tab. 8 - Laboratori che hanno registrato tempi d'incubazione della fase di pre-arricchimento che si discostano dal metodo di riferimento.

In merito alla conferma sierologica, per quattro laboratori (L000375; L000485; L000734; L000761) questa non risulta essere stata effettuata.

## 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 5, 6 e 7.

## 7. CONCLUSIONI

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

Nessun laboratorio ha segnalato criticità rispetto allo stato del materiale di riferimento fornito per eseguire il circuito.

**I risultati del presente circuito rimangono validi, nel contesto delle analisi previste dal Piano Nazionale per le Salmonellosi, fino al 31 dicembre del terzo anno a partire dall'anno di partecipazione.**

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 2021).

Responsabile Circuito Interlaboratorio Aqua

Dr.ssa Lisa Barco



Errata Corrige – aggiunta tabella n. 7 pag. 7.

-----FINE REPORT-----

## Note

- 1) **I laboratori, al momento dell'iscrizione al circuito interlaboratorio AQUA, sono resi anonimi e identificati solo tramite codici alfa-numeric (L000XXX).** Ai sensi degli artt. 13 e 14 Reg UE 2016/679 si rende la presente informativa privacy.  
Titolare del trattamento: ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE VENEZIE (in sigla IZSVE), con sede legale in 35020 LEGNARO (PD), Viale dell'Università 10, C.F. e P.IVA 00206200289, in persona del Direttore generale e legale rappresentante pro tempore tel 0498084242, e-mail [dirgen@izsvenezie.it](mailto:dirgen@izsvenezie.it). In particolare, i dati verranno trattati dal personale delle strutture complesse che erogano il circuito AQUA. Responsabile della protezione dei dati dell'IZSVE ai sensi dell'art. 37 GDPR (RPD/DPO), contattabile all'indirizzo e-mail [dpo@izsvenezie.it](mailto:dpo@izsvenezie.it).  
  
Tipologia di dati e fonti: dati comuni, anagrafici e identificativi. Provengono tutti dall'Interessato. Finalità e modalità: i dati saranno trattati per l'adempimento di obblighi legali connessi all'iscrizione / adesione al circuito Aqua; il trattamento avverrà in modo sia manuale/cartaceo, che elettronico. Base giuridica: il trattamento si fonda, oltre che sul consenso manifestato tramite conferimento volontario dei dati, sull'adempimento di un obbligo contrattuale nonché sul legittimo interesse del Titolare. Obbligatorietà: il conferimento dei dati è obbligatorio e la sua mancanza comporta l'impossibilità per il Titolare di eseguire la prestazione richiesta e di evadere la richiesta di iscrizione al circuito Aqua. Destinatari: i dati potranno essere comunicati a soggetti all'uopo Incaricati dal Titolare, a Responsabili del trattamento e consulenti del Titolare. Conservazione: i dati saranno conservati fino a revoca del consenso. Diritti: l'Interessato può esercitare i suoi diritti di accesso, rettifica, cancellazione, limitazione, portabilità, opposizione via email ai dati del Titolare di cui sopra. Reclamo: l'Interessato può proporre reclamo al Garante per la protezione dei dati personali. Revoca: il consenso può essere revocato, ma ciò potrebbe comportare l'impossibilità di evadere la richiesta di iscrizione al circuito Aqua o la cancellazione dell'iscrizione al circuito medesimo.
- 2) Tutti gli operatori dell'Organizzazione del circuito interlaboratorio AQUA SA sono tenuti alla riservatezza sia relativamente alla identità dei partecipanti, sia alle informazioni intercorse.

## Il presente report è a cura di

Lisa Barco, Cristina Saccardin, Paola Pestelli

## Responsabile circuito interlaboratorio

Dr.ssa Barco Lisa

Tel.0498084137

## Responsabile tecnico

Dr.ssa Cristina Saccardin

Tel. 049 8084283

e-mail [crns.circuiti@izsvenezie.it](mailto:crns.circuiti@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](http://www.izsvenezie.it)