

Circuito interlaboratorio di isolamento e identificazione Salmonella spp. da campioni prelevati a livello di produzione primaria

Report definitivo Schema AQUA SA 3b-22 (laboratori privati)

2022











Responsabile Circuito interlaboratorio Aqua isolamento e identificazione di Salmonella

Dott.ssa Lisa Barco Tel. 049 808 4137 e-mail crns.circuiti@izsvenezie.it

Responsabile tecnico

Dott.ssa Cristina Saccardin Tel. 049 808 4283 e-mail crns.circuiti@izsvenezie.it

Responsabile statistico

Dott.ssa Marzia Mancin Tel. 049 808 4431 e-mail mmancin@izsvenezie.it

Segreteria

Dott.ssa Paola Pestelli Tel. 049 808 4137 e-mail crns.circuiti@izsvenezie.it

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







Report definitivo

Sommario

Report definitivo	4
Introduzione	4
Laboratori partecipanti	4
Caratteristiche, composizione e controllo campioni	6
1.1 Composizione dei campioni prova	6
1.1.1 Materiale di Riferimento	6
1.1.2 Matrice	6
1.2 Prove di omogeneità e stabilità	6
2. Invio, istruzioni e modalità operative	7
3. Valori assegnati	8
3.1 Analisi dei dati	8
3.2 Criteri per la definizione di "buona performance"	8
4. Elaborazione dei risultati delle analisi sui campioni prova e valutazione della performance	9
5. Risultati	11
5.1 Commenti e valutazioni dati tecnici	11
5.2 Sintesi dei risultati	11
5.3 Valutazione della performance dei laboratori partecipanti	11
6. Conclusioni	13
Privacy	13
Indice delle Tabelle	
Tab. 1 – Calendario attività	5
Tab. 2 – Allestimento campioni di prova.	7
Tab. 3 – Criteri di conformità per campioni artificialmente contaminati MR con un livello noto di Salmonella Agbeni	9
Tab. 4 – Criteri di conformità per campioni artificialmente contaminati con MR non contenente alcun microrganismo	9
Tab. 5 – Criteri di conformità per campioni e controlli	9
Tab. 6 – Riepilogo metodi utilizzati	11
Tab. 7 -Tabella riassuntiva delle distribuzioni e della valutazione della performance sulla base dei criteri di accettabi	ilità 12





REPORT DEFINITIVO

INTRODUZIONE

Uno dei principali compiti dei Centri di Referenza Comunitari e Nazionali, come stabilito anche dal Regolamento UE 2017/625, è quello di organizzare circuiti interlaboratorio al fine di valutare le performance analitiche dei laboratori partecipanti.

Per quanto riguarda l'isolamento di *Salmonella* spp. in campioni di origine animale (produzione primaria), la necessità di garantire elevati standard qualitativi diviene un requisito fondamentale secondo le prescrizioni del Regolamento CE 2160/2003 e dei successivi emendamenti, che prevedono l'attuazione di piani nazionali di controllo finalizzati a ridurre la prevalenza di sierotipi rilevanti per la salute pubblica di *Salmonella* spp. in determinate specie produttive.

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

Questo circuito di isolamento di *Salmonella* spp. rappresenta l'undicesimo organizzato dal CRNS e dedicato esclusivamente ai laboratori privati, a seguito di quanto previsto dall'Allegato 6 del "Piano Nazionale di Controllo delle Salmonellosi negli Avicoli 2022-2024 (PNCS)" avente come oggetto la "Procedura operativa per l'identificazione dei laboratori privati che intendono eseguire l'analisi di isolamento di *Salmonella* spp. dai campioni prelevati dagli OSA in ambito PNCS".

LABORATORI PARTECIPANTI

Al presente circuito Sa3b-22, hanno preso parte 15 laboratori privati. Ciascun laboratorio è stato identificato con un codice numerico assegnato dal portale Aquaweb.

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

Scadenze	Attività
Entro il 10/07/2022	Scadenza iscrizione
Entro il	Pubblicazione pianificazione e protocollo delle modalità operative.
21/10/2022	Si ricorda che ciascun laboratorio dovrà procedere a procurarsi il materiale necessario, come indicato nel protocollo.
Settimana dal 10/10/2022 al 14/10/2022	Spedizione del materiale ai laboratori coinvolti tramite corriere. Immediatamente dopo l'arrivo del materiale ciascun laboratorio deve: - Verificare la presenza ed integrità di tutto il materiale previsto - Conservare il materiale come segue: matrice e flaconcini di MRM i tra +2°C e +8°C; Nel caso in cui il laboratorio non riceva il materiale nel periodo indicato, o vi siano anomalie del materiale consegnato, si prega di contattare tempestivamente il CNRS.
Dal 24/10/2022 al 28/10/2022	Analisi dei campioni prova da parte di ciascun laboratorio partecipante.





Entro il 11/11/2022	Inserimento dei risultati nella scheda di inserimento risultati presente in AQUAWEB. Non sarà possibile inserire risultati oltre la data indicata, inoltre risultati inviati con altre modalità non verranno presi in considerazione
Entro il 21/11/2022	Pubblicazione Report Parziale in Aquaweb con indicazione del risultato atteso.

Tab. 1 – Calendario attività

Al fine di tutelare la riservatezza dei dati nel presente documento i laboratori partecipanti sono resi anonimi e identificati esclusivamente tramite codice alfa-numerico.

Tutti gli operatori dell'organizzazione del circuito interlaboratorio AQUA SA sono tenuti alla riservatezza sia relativamente alla identità dei partecipanti, sia alle informazioni intercorse.

1. CARATTERISTICHE, COMPOSIZIONE E CONTROLLO CAMPIONI

La metodica di riferimento da impiegarsi nel presente circuito di isolamento di *Salmonella* spp. è quella riportata nella UNI EN ISO 6579-1:2020 o altro metodo alternativo utilizzato presso il laboratorio, purché validato in accordo alla EN/ISO 16140 rispetto alla suddetta metodica ISO.

1.1 Composizione dei campioni prova

1.1.1 Materiale di Riferimento

Per l'esecuzione del circuito è stato utilizzato materiale di riferimento microbiologico (MRM) liofilizzato negativo e MRM liofilizzato positivo. I MRM sono prodotti dal laboratorio IZSVe AQUA MA (presso SCS8, dott.ssa Maria Grimaldi).

II MRM negativo (lotto M-22) non contiene alcun microrganismo.

Il MRM positivo (lotto I-22) è costituito da *Salmonella* Agbeni e latte, utilizzato come crioprotettore (latte scremato UHT senza grassi); il range di valore medio è compreso tra 63 – 94 CFU/campione.

Il MRM destinato a ogni laboratorio partecipante è stato preparato secondo le istruzioni descritte nelle modalità operative disponibili nel portale Aquaweb, ed ogni flaconcino è stato siglato da A1 ad A7 e da C1 a C2.

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

- 5 flaconcini di sierotipo di Salmonella Agbeni, di cui 4 da addizionare ai campioni di feci di origine animale negativi per Salmonella spp. ed uno per allestire il controllo denominato C1 (in assenza di matrice);
- 4 flaconcini "bianchi" non contenenti Salmonella Agbeni di cui 3 da addizionare ai campioni di feci di origine animale negativi per Salmonella spp. ed uno per allestire il controllo denominato C2 (in assenza di matrice).

1.1.2 Matrice

Ai laboratori partecipanti sono state inviate aliquote di circa 200 g di feci di pollo negative per Salmonella spp.





La negatività della matrice è stata verificata su 10 aliquote ottenute dal lotto originale della matrice dopo averla opportunamente omogenata.

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 6579-1:2020. 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) e degli Enterobatteri (procedura UNI EN ISO 21528-2).

I risultati delle analisi sono i seguenti: 15*108 ufc/g (carica mesofila totale) e 61*106 ufc/g (Enterobacteriaceae).

Le aliquote di feci destinate ai singoli partecipanti sono state conservate in sacchetti sigillati, mantenuti a temperatura di congelamento (≤-18°C) fino al momento della spedizione.

1.2 PROVE DI OMOGENEITÀ E STABILITÀ

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

Le informazioni relative alle prove di stabilità e omogeneità sono disponibili, su richiesta, presso l'organizzatore.

2. INVIO, ISTRUZIONI E MODALITÀ OPERATIVE

Il materiale per l'esecuzione del circuito è stato inviato secondo la classificazione BIOL.SUB.CAT.B UN 3373, richiedendo il mantenimento alla temperatura di refrigerazione.

Il materiale è stato consegnato ai partecipanti nella settimana dal 10/10/2022 – 14/10/2022 come previsto. I laboratori partecipanti non hanno segnalato anomalie al momento della ricezione del materiale.

A ciascun laboratorio partecipante sono stati resi disponibili nel gestionale AQUAWEB, anticipatamente rispetto all'esecuzione delle analisi, la pianificazione e il protocollo operativo (Allegato 1), contente indicazioni anche sulle modalità di trasmissione dei risultati. Il documento relativo alla SCHEDA DI SICUREZZA dei campioni prova, è stato reso disponibile nel sito dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (http://www.izsvenezie.it/servizi/altri-servizi/circuito-interlaboratorio-aqua/).

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

Campione di prova	APTS 225 ml	MRM	FECI 25g
A1	SI	SI	SI
A2	SI	SI	SI





A3	SI	SI	SI
A4	SI	SI	SI
A5	SI	SI	SI
A6	SI	SI	SI
A7	SI	SI	SI
C1	SI	SI	NO
C2	SI	SI	NO
C3	SI	NO	SI
C4	SI	NO	NO

Tab. 2 - Allestimento campioni di prova

I campioni prova (siglati da A1 ad A7) e i controlli (siglati da C1 a C2) sono stati inviati ai laboratori secondo n. 3 distribuzioni (ovvero rimane invariato il rapporto positivi/negativi con una sequenza diversa per ciascuna distribuzione). Le distribuzioni sono state indicate nel report parziale, pubblicato nella piattaforma Aquaweb in data 21/11/2022; il valore assegnato coincide con l'esito atteso che è definito dall'organizzatore del circuito AQUA SA in quanto derivante dalla conoscenza della preparazione dei campioni prova da analizzare o dall'utilizzo di materiale di riferimento.

3. VALORI ASSEGNATI

I risultati trasmessi dai laboratori partecipanti, ovvero l'indicazione di presenza/assenza di *Salmonella* spp. nei controlli (da C1 a C4) e nei campioni (da A1 ad A7) sono stati confrontati con il risultato atteso riportato nel Report parziale, redatto in data 21/11/2022.

Nel Report parziale sono stati riportati i risultati attesi per ciascuna delle n. 3 distribuzioni. Contestualmente alla pubblicazione, tramite Aquaweb, ogni laboratorio partecipante ha ricevuto comunicazione della distribuzione di riferimento.

Sono stati definiti i sequenti criteri di accettabilità per la valutazione della performance dei laboratori:

- Controllo in assenza di matrice "C1-C2-C4": 0 errori.
- Controllo in presenza di matrice "C3": accettabile 1 errore.
- Campione negativo in presenza di matrice: accettabile 1 errore.
- Campione positivo in presenza di matrice: accettabile 1 errore.

3.1 Analisi dei dati

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

0 10 - 10	Numero di risultati negativi	4000/
Specificità:	Numero totale di campioni realmente negativi	x 100%





Sensibilità:	Numero di risultati positivi	x 100%
Sensibilita.	Numero totale di campioni realmente positivi	X 100%
Accuratezza:	Numero di risultati corretti (positivi e negativi)	x 100%
Accuratezza.	Numero totale di campioni (positivi e negativi)	X 100 /6

Sono state inoltre sottoposte a verifica le informazioni trasmesse dai partecipanti, al fine di evidenziare eventuali anomalie nell'esecuzione del protocollo.

3.2 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 3 e 4 sono indicati i risultati minimi, in termini di risultati corretti, per quanto riguarda i campioni contaminati rispettivamente con MRM di S. Agbeni e con MRM negativo non contenente alcun microrganismo (bianco)

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 il "bianco", 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.

	Risultati minimi		
CAMPIONI	% positivi N° test corretti/ N° totale di campio		
MRM (S. Agbeni)	75%	3/4	

Tab. 3 - Criteri di conformità per campioni artificialmente contaminati MR con un livello noto di S. Agbeni

	Risultati minimi		
CAMPIONI	% positivi N° test corretti/ N° totale di campion		
MRM (Bianco)	~66%	2/3	

Tab. 4 - Criteri di conformità per campioni artificialmente contaminati con MRM non contenente alcun microrganismo

	Limiti di accettabilità	
CONTROLLI	% positivi	N° test corretti N° totale di controlli





MRM (Bianco)	~33%**	1/3*
MRM (S. Agbeni)	100%	1/1

Tab. 5 – Criteri di conformità per campioni e controlli

4. ELABORAZIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI SUI CAMPIONI PROVA E VALUTAZIONE DELLA PERFORMANCE

I dati tecnici sono stati riportati da tutti i n. 15 partecipanti che hanno inviato la scheda di inserimento dei risultati.

Per quanto riguarda il metodo utilizzato:

- 13 laboratori hanno utilizzato esclusivamente il metodo UNI EN ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020
- 1 laboratorio (L000672), oltre al metodo di cui alla UNI EN SO 6579-1:2017/Amd 1:2020, ha utilizzato anche un metodo alternativo
- 1 laboratorio (L000590), oltre al metodo di cui alla UNI EN SO 6579-1:2017/Amd 1:2020, ha utilizzato anche due metodi alternativi

Nella Tabella 6 si fornisce un riepilogo dei metodi utilizzati da ciascun laboratorio partecipante.



^{*}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)





Х		
Х		
Х		
X		
Х	vidas	PCR
X		
Х		
X		
X	AFNOR 3M 01/16-11/16	
X		
X		
X		
Х		
X		
X		
	X X X X X X X X X	X X X X X Vidas X X X X X X X X X X X X X X X X X X X

Tab. 6 - Riepilogo metodi utilizzati

Tutti i laboratori hanno rapidamente posto il materiale alla temperatura di conservazione indicata.

5. RISULTATI

5.1 Commenti e valutazioni dati tecnici

Il metodo più utilizzato è stato il metodo standard (UNI EN ISO 6579-1:2017/ Amd 1:2020).

Tutti i laboratori hanno riportato le prove biochimiche utilizzate.

I laboratori L000672 e L000897 non hanno eseguito le prove di conferma sierologica.

5.2 Sintesi dei risultati

Valutazione Controlli da C1 a C3

Tutti i laboratori hanno identificato correttamente i controlli da C1 a C3.

Valutazione Campioni artificialmente contaminati da A1 ad A7

Per la distribuzione 1, due laboratori non hanno identificato correttamente tutti i campioni artificialmente contaminati. Il laboratorio L000785 non ha rilevato la presenza di *Salmonella* nel campione contaminato A3. Tale risultato è considerato soddisfacente. Il laboratorio L000897 non ha rilevato la presenza di *Salmonella* in due campioni contaminati (A1 e A7). Tale risultato è considerato NON soddisfacente.

Per la distribuzione 2, due laboratori non hanno identificato correttamente tutti i campioni artificialmente contaminati. Il laboratorio L000590 non ha eseguito l'analisi sul campione A6; tale risultato è considerato





soddisfacente. Il laboratorio L000786 ha rilevato la presenza di *Salmonella* in un campione "bianco"; tale risultato è considerato soddisfacente.

Per la distribuzione 3, un laboratorio non ha identificato correttamente tutti i campioni. Il laboratorio L000853 non ha rilevato la presenza di *Salmonella* nel campione artificialmente contaminato A4; tale risultato è considerato soddisfacente.

Non si sono riscontrate discordanze di risultati ottenuti dai laboratori che hanno utilizzato in parallelo due o più metodi.

5.3 Valutazione della performance dei laboratori partecipanti

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
L000479	1	OK	OK	OK
L000500	2	OK	OK	OK
L000580	3	OK	OK	OK
L000584	1	OK	OK	OK
L000590	2	OK	OK	NO
L000652	3	OK	OK	OK
L000653	1	OK	OK	OK
L000661	2	OK	OK	OK
L000672	3	OK	OK	OK
L000785	1	OK	NO	OK
L000786	2	OK	OK	NO
L000796	3	OK	OK	OK
L000853	3	OK	NO	OK
L000897	1	OK	NO	OK
L000900	2	OK	OK	OK

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

In data 21/11/2022 è stato pubblicato il report parziale nella piattaforma Aquaweb, relativo al risultato atteso per ciascun isolato previsto dal circuito. In tal modo, ogni laboratorio partecipante ha potuto verificare la concordanza o la discordanza tra i propri risultati e gli esiti.





6. CONCLUSIONI

Dei n. 15 laboratori partecipanti al circuito SA3b del 2022, 14 laboratori hanno soddisfatto i criteri minimi previsti, ottenendo performance adeguata.

Un laboratorio (L000897) non ha soddisfatto i criteri minimi di accettabilità, avendo ottenuto risultato non conforme in due campioni artificialmente contaminati, quindi la performance è da ritenersi NON soddisfacente. Il laboratorio che non ha ottenuto risultati soddisfacenti verrà contattato individualmente ed informato su modalità e tempi relativi ai controlli di follow-up.

Le attività di Follow-up sono gestite direttamente tra l'organizzatore e il laboratorio partecipante tramite comunicazioni via e-mail utilizzando la casella di posta dedicata CRNS.circuiti@izsvenezie.it.

I risultati del circuito (Report definitivo), con il dettaglio relativo ai laboratori partecipanti, verranno inviati dal CRNS al Ministero della Salute, ad ACCREDIA e al COVEPI al fine dell'aggiornamento dell'elenco dei laboratori di cui all'allegato 6 del PNCS. L'aggiornamento sarà applicato ai laboratori che hanno ottenuto risultati soddisfacenti; per quanto riguarda i laboratori che hanno ottenuto risultati non soddisfacenti la valutazione della performance sarà subordinata all'esito del circuito di follow-up.

Il risultato conseguito nel presente circuito rimane valido fino al 31 dicembre 2025.

Nota (AQUA SA Laboratori privati)

I risultati del circuito (Report definitivo), con il dettaglio relativo ai laboratori partecipanti, verranno inviati dal CRNS al Ministero della Salute, ad ACCREDIA e al COVEPI al fine dell'aggiornamento dell'elenco dei laboratori di cui all'allegato 6 del PNCS. L'aggiornamento sarà applicato ai laboratori che hanno ottenuto risultati soddisfacenti; per quanto riguarda il laboratorio che hanno ottenuto risultati non soddisfacenti la valutazione della performance è subordinata all'esito del circuito di follow-up.





PRIVACY

1 I laboratori, al momento dell'iscrizione al circuito interlaboratorio AQUA, sono resi anonimi e identificati solo tramite codici alfa-numerici (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. 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.

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.

Report definitivo, 21/12/2022

II Responsabile del Circuito Interlaboratorio AQUA SA

Dr.ssa Lisa Barco

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