Check&Trace Salmonella 2.0

Per l'uso con i termociclatori per PCR in tempo reale CFX Opus 96 e Bio-Rad CFX 96

9-0152 Italiano
v2025-03(7)

1 USO PREVISTO

Il saggio Check&Trace Salmonella 2.0 è un test PCR in tempo reale qualitativo e semiautomatico, progettato per la conferma e la tipizzazione dei presunti isolati di *Salmonella* da terreni di coltura arricchiti. La procedura di conferma consente di confermare se un sospetto (presunto) risultato di positività alla *Salmonella* (secondo la norma ISO-6579-1) è effettivamente un risultato di positività per *Salmonella spp.* confermato oppure è un risultato negativo. La procedura di tipizzazione genera un risultato relativo al serovar o un codice di "genovar", in entrambi i casi definendo ciascun isolato batterico testato.

Il test viene eseguito dopo un semplice passaggio di preparazione del campione dei batteri provenienti da una coltura. Il campione viene poi usato come materiale di ingresso per un saggio PCR multiplex in tempo reale a 6 provette eseguito sul sistema Bio-Rad CFX 96 o CFX Opus 96. Per ciascuna PCR multiplex vengono valutate la presenza e l'assenza di sequenze target per la conferma e la tipizzazione e viene generato automaticamente un risultato finale del test mediante un software dedicato.

2 SINTESI E DESCRIZIONE DELLA PROCEDURA

La *Salmonella* è una delle principali cause di intossicazione alimentare. Pertanto, in molti Paesi il rilevamento della *Salmonella* nei cibi e negli alimenti è obbligatorio. I protocolli standard per il rilevamento della *Salmonella* richiedono molto tempo: sono difatti necessari diversi giorni per ottenere un risultato finale positivo o negativo (ISO-6579/1). In caso di risultato positivo per la *Salmonella*, in molti Paesi occorre tipizzare ulteriormente tale patogeno ai fini delle valutazioni epidemiologiche e del rischio per la salute. Solitamente tale tipizzazione viene eseguita mediante la sierotipizzazione di due antigeni: il lipopolisaccaride (O) somatico e la proteina (H) flagellare (ISO-6579/3). Tuttavia, i batteri *Salmonella* sono complessi dal punto di vista antigenico con oltre 2.400 serovar con diverse combinazioni dei 46 antigeni O e degli 85 antigeni H (3). Pertanto, una volta riscontrata la positività, l'ulteriore tipizzazione di un risultato positivo per la *Salmonella* può nuovamente richiedere altri giorni, richiedendo molti antisieri O e H per la tipizzazione completa.

La tipizzazione del DNA è diversa dalla sierotipizzazione. La sierotipizzazione consente di rilevare la presenza dei flagelli e degli antigeni sulla superficie cellulare. Ciò si basa sull'espressione di geni situati su due segmenti specifici del genoma della *Salmonella*. Il saggio CTS 2.0 rileva la variazione genetica su 21 loci sparsi nell'intero genoma della *Salmonella*, generando i così genotipi specifici della *Salmonella*, altresì definiti genovar. Il database del CTS 2.0 mette in relazione i genovar con una raccolta di serovar di *Salmonella* ben caratterizzati. In assenza di un serovar stabilito per il genovar generato dal saggio CTS 2.0, sarà fornito un genovar come risultato del test.

Il saggio CTS 2.0 consente di eseguire la conferma e la tipizzazione della *Salmonella* in circa 2,5 ore servendosi di batteri su una piastra agar nutriente (NA) o XLD. La presenza di sequenze target di DNA per la tipizzazione e la conferma è rilevata parallelamente con diversi controlli interni. Il CTS 2.0 si serve di un processo per la preparazione dei campioni rapido e semplice e riduce al minimo l'intervento dell'operatore una volta che i campioni vengono posizionati sul sistema per PCR in tempo reale.

PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Sul portale di analisi del CTS 2.0 viene generata un elenco di lavoro. Gli specimen batterici vengono raccolti dai terreni XLD o NA mediante "campionatori di colonie" inclusi nel kit del CTS 2.0. I campionatori di colonie vengono quindi collocati nelle provette da 1,5 ml preriempite con 200 µl di tampone per campioni. I batteri vengono risospesi in questo tampone e le provette vengono chiuse e trasferite in un blocco riscaldante preriscaldato a 98 °C. Le provette vengono incubate per 10 minuti a 98 °C e fatte raffreddare a temperatura ambiente per 5 minuti. Questa procedura consente di ottenere degli specimen un lisato grezzo che rilascia il DNA batterico nel tampone per campioni. Questo lisato grezzo può essere usato senza ulteriore purificazione per il processo di amplificazione in tempo reale con CTS 2.0.

In una provetta fresca preriempita con 35 µl di master mix per PCR vengono trasferiti 140 µl di lisato grezzo, che vengono poi miscelati pipettando verso l'alto e verso il basso per 3 volte. Successivamente, 25 µl di soluzione a base di lisato grezzo/master mix vengono aggiunti a ciascuna delle 6 provette della striscia reattiva per PCR del CTS 2.0. Questa striscia reattiva contiene tutti i primer e le sonde per PCR per l'amplificazione e il rilevamento della sequenza target mediante PCR in tempo reale. Infine, la striscia reattiva per PCR viene collocata nello strumento PCR in tempo reale e si dà inizio al processo di amplificazione.

I target di DNA amplificati vengono rilevati mediante sonde a idrolisi (TaqMan®), etichettate su una estremità con un colorante fluorescente reporter (fluoroforo) e sull'altra estremità con una porzione di quencher. Le sonde etichettate con diversi fluorofori vengono usate per rilevare le diverse sequenze target; possono essere usati fino a 5 fluorofori per provetta di reazione. Il CTS 2.0 può rilevare un totale di 27 marcatori di DNA, compresi 6 controlli mediante 6 PCR multiplex in tempo reale in parallelo. I marcatori di controllo valuteranno la presenza o l'assenza di *Salmonella* e rileveranno l'eventuale fallimento della reazione. L'assenza o la presenza di ciascuno dei 21 marcatori di DNA rimanenti genera un'"impronta genetica" unica, utilizzata per determinare il tipo di *Salmonella*.

Il saggio CTS 2.0 usa un software dedicato per l'elaborazione dei risultati in un processo a 2 fasi. Nella prima fase viene stabilita l'assenza e la presenza di ciascuno dei 27 marcatori di DNA. Ciò genera un pattern unico di presenza/assenza per tutti i marcatori di DNA, ovvero l'"impronta genetica". Nella seconda fase, questa "impronta genetica" viene abbinata a un database contenente le impronte genetiche di molti serovar di *Salmonella*. Se viene trovato un abbinamento, il software genererà un risultato di serovar dai saggi del CTS 2.0. Se invece non viene trovato alcun abbinamento, ma viene confermato il genere *Salmonella*, sarà generato un risultato di genovar.

Contenuto del kit	Quantità
Strisce reagenti per PCR CTS 2.0 *Strisce (con tappi) per PCR con 12 provette ciascuna, contenenti 2 unità di 6 serie di primer specifici per il target e sonde fluorescenti in formato secco*	3 sacchetti contenenti ciascuno 8 strisce reagenti per PCR con 12 provette
Master mix per PCR CTS 2.0 *Master mix per PCR con DNA polimerasi, dNTP, tampone di reazione e stabilizzatori*	2 provette con 1 ml ciascuna
Tampone per campioni	1 flaconcino con 12 ml
Campionatori di colonie	90

3 ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Sistema per PCR in tempo reale Bio-Rad CFX 96 o CFX Opus 96
- Agitatore vortex
- Blocco riscaldante per provette Eppendorf
- Centrifuga per provette Eppendorf
- Centrifuga per piastre per microtitolazione
- Supporto per provette Eppendorf
- Provette Eppendorf
- Supporto per strisce reagenti per PCR
- Pipette e puntali con filtro idrofobo monouso per volumi da 20 e 200 µl
- Camice da laboratorio e guanti monouso senza polvere

4 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Attenzione: questa procedura utilizza/rileva microrganismi patogeni e/o i loro prodotti metabolici. È necessario prestare attenzione per evitare l'ingestione o l'inalazione di aerosol potenzialmente infettivi o il contatto con la pelle. Il personale di laboratorio deve seguire le opportune precauzioni di sicurezza del laboratorio e avere accesso immediato alle schede informative sulla sicurezza dei materiali associate (SDS, http://www.ilpi.com/msds/). Durante la manipolazione degli agenti patogeni, il personale deve utilizzare un adeguato contenimento di biosicurezza (https://www .cdc.gov/labs/BMBL.html) ed essere dotati di adeguati dispositivi di protezione individuale, inclusi indumenti, guanti protettivi e un'adeguata protezione per gli occhi.
- Il saggio CTS 2.0 è destinato esclusivamente all'uso in laboratorio.
- Non usare il kit se l'etichetta che sigilla la scatola esterna è rotta.
- Non utilizzare i reagenti se alla consegna i rispettivi sacchetti di protezione sono aperti o rotti.
- Chiudere tempestivamente i sacchetti protettivi dei reagenti con il sigillo a zip dopo ogni utilizzo. Prima di chiuderli rimuovere dai sacchetti eventuale aria in eccesso.
- Non rimuovere l'essiccante dai sacchetti dei reagenti.
- Non utilizzare i reagenti in caso di assenza o rottura dell'essiccante nei sacchetti di protezione.
- Non utilizzare i reagenti se la pellicola è rotta o danneggiata.
- Non miscelare i reagenti di diversi sacchetti e/o kit e/o lotti.
- Non usare reagenti e/o materiali scaduti.
- Non esporre le strisce reagenti per PCR a luce eccessiva onde evitare la degradazione dei fluorofori a causa del photobleaching.
- Utilizzare guanti senza polvere ed evitare di lasciare impronte o di scrivere sui tappi delle strisce reagenti per PCR.
- Ai fini della corretta esecuzione di questo saggio è fondamentale utilizzare una buona tecnica di laboratorio. In virtù dell'elevata sensibilità analitica del test, prestare la massima attenzione per preservare la purezza di tutti i materiali e i reagenti.
- Onde evitare la contaminazione ad opera degli ampliconi, non aprire le strisce reagenti per PCR del CTS 2.0 dopo l'uso, bensì smaltirle immediatamente.
- Manipolare sempre gli speciment in conformità alle procedure di laboratorio sicure adottate nei laboratori microbiologici.
- Indossare abbigliamento protettivo e guanti monouso durante la manipolazione di tutti i reagenti.
- Lavare accuratamente le mani dopo l'esecuzione del test.
- Non fumare, bere, masticare o mangiare in aree in cui si manipolano gli specimen o i reagenti del kit.
- Smaltire i reagenti inutilizzati e i rifiuti secondo le normative locali, statali, provinciali e/o federali.

5 CONSERVAZIONE E STABILITÀ

I reagenti e i componenti del saggio CTS 2.0 sono stabili a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata. Non usare i componenti scaduti. Le strisce reagenti per PCR del CTS 2.0 sono fornite in sacchetti sigillati. Per proteggerle dall'umidità, risigillarle immediatamente dopo l'apertura.

Le strisce reagenti per PCR sono stabili fino a 30 giorni a 2-8 °C dopo l'apertura iniziale e la richiusura del sacchetto.

6 ISTRUZIONI PER L'USO

Generazione dell'elenco di lavoro

1. Effettuare l'accesso al portale Check-Points CTS 2.0 Analysis mediante indirizzo e-mail e password.
2. Aprire il menu facendo clic sull'icona in alto a sinistra, quando non è visibile.
3. Aprire la scheda delle sessioni dei cicli facendo clic su "**Sessioni dei cicli**".
4. Aggiungere una nuova sessione di ciclo facendo clic sull'icona in alto a destra. Viene generato automaticamente un identificatore globale che non può essere modificato. L'identificativo personalizzato della corsa può essere inserito in "Dettagli".
5. Seleziona il "Lot number" dal menu a tendina e seleziona il "qPCR cycler" corretto da utilizzare (entrambi obbligatori). "Custom run identifier" (identificatore personalizzato della corsa) e "Run session notes" (Note sulla corsa di analisi) sono facoltativi
6. Per aggiungere campioni, fare clic sull'icona della pipetta e inserire le informazioni sul campione. È obbligatorio indicare i "nomi dei campioni" ed è possibile inserire altre informazioni quali "Ubicazione del campione", "Lotto di produzione", "Origine del campione", "Dispositivo di campionamento" e "Data di campionamento".
7. Fare clic su "**Salva + Nuovo**" per passare al nuovo campione e proseguire fino al campione finale. Dopodiché fare clic su "**Salva**".
8. In alternativa, fare clic sull'icona di importazione dei campioni per caricare un file CSV o XLSX con le informazioni sui campioni. È possibile scaricare il formato di file mediante il pulsante di esportazione
9. Fare clic su "**Scarica file del ciclo cfx**". Verrà così generato il file del ciclo per avviare il ciclo della PCR in tempo reale nel passaggio "Funzionamento del sistema PCR". Se le informazioni sul campione vengono modificate in seguito, fare sempre clic prima su "**Scarica file del ciclo cfx**" per avere il file .plrn (LIMS) più recente per il termociclatore. L'esecuzione del test con il file runfile Lims obsoleto risulterà in un errore durante l'analisi
10. Dopodiché, scaricare e stampare un elenco di lavoro per l'uso nel laboratorio facendo clic sull'icona in alto a destra.
11. Procedere alla preparazione dal campione.

Preparazione del campione

NOTA: viene usata una (1) striscia reattiva per PCR per due (2) campioni. Qualora il numero di campioni fosse dispari, integrare con campioni da un ceppo di controllo (di riferimento).

1. Accendere il blocco riscaldante a **98 °C**.
2. Erogare **200 µl** di tampone per campioni in una provetta da 1,5 ml. Utilizzare una provetta separata per ciascun campione e scrivere l'ID campione sulla provetta.
3. Penetrare in una singola colonia nell'agar mediante un apposito campionatore. Toccare brevemente il fondo della piastra e riestrarre il campionatore. Tenere sempre il campionatore di colonie in posizione verticale come mostrato nella Figura 1.

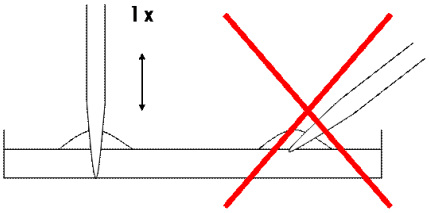


Figura 1: Tecnica corretta

4. Posizionare il campionatore di colonie nella provetta da 1,5 ml con **200 µl** di tampone per campioni e far rotolare il campionatore tra il pollice e l'indice per almeno 5 volte avanti e indietro, rimanendo nel tampone.
5. Estrarre e smaltire il campionatore di colonie.
6. Chiudere la provetta e agitare brevemente tramite vortex.
7. Collocare le provette nel blocco riscaldante pre-riscaldato e incubare per **10 minuti a 98 °C**.

8. Agitare le provette tramite vortex e collocarle sul banco da laboratorio per farle raffreddare a temperatura ambiente per almeno 5 minuti. Se i campioni non vengono usati direttamente, centrifugare brevemente e conservare le provette a -20 °C.
9. Procedere alla "Configurazione della PCR in tempo reale".

Configurazione della PCR in tempo reale

NOTA: i campioni conservati a -20 °C devono essere lasciati a temperatura ambiente per 15 minuti, agitati tramite vortex e centrifugati brevemente.

1. Erogare **35 µl** di master mix per PCR in una provetta da 1,5 ml. Utilizzare una provetta separata per ciascun campione e scrivere l'ID campione sulla provetta.
2. Centrifugare brevemente i campioni preparati nel passaggio precedente e aggiungere un campione da **140 µl** al master mix per PCR. Miscelare pipettando delicatamente verso l'alto e verso il basso per 3 volte.
3. Estrarre il numero richiesto di strisce reagenti per PCR dai rispettivi sacchetti protettivi. Rimuovere l'aria in eccesso e chiudere i sacchetti con il sigillo a zip. Etichettare l'estremità di ciascuna striscia reattiva per PCR con l'identificazione dello specimen appropriata.
4. Rimuovere attentamente i tappi delle strisce e tenerli separati.

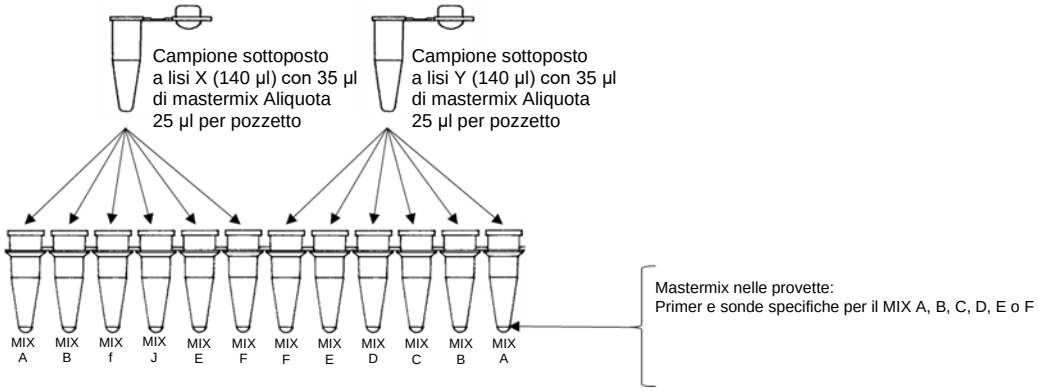


Figura 2 Schema di pipettamento per specimen Campione/Master mix.

5. Trasferire **25 µl** del primo specimen Campione/Master mix alla provetta 1 di striscia reattiva per PCR (Figura 2). Ripetere questo passaggio per le provette 2-6.
6. Trasferire **25 µl** del secondo specimen Campione/Master mix alla provetta 7 di striscia reattiva per PCR. Ripetere questo passaggio per le provette 8-12 (Figura 2).
7. Procedere fino al trasferimento di tutti gli specimen Campione/Master mix alle rispettive strisce reagenti per PCR.
8. Ricollocare attentamente i tappi sulle strisce. Accertarsi che i tappi delle strisce siano sigillati ermeticamente onde evitare l'evaporazione durante la PCR e **centrifugare brevemente**.
9. Accendere il sistema per PCR e il computer.
10. Aprire il coperchio del termociclatore per PCR in tempo reale.
11. Collocare le strisce reagenti per PCR nell'apposito macchinario servendosi dell'elenco di lavoro creato secondo la sezione "Generazione dell'elenco di lavoro". Se necessario, posizionare delle strisce reagenti per PCR "fittizie" secondo l'elenco di lavoro al fine di distribuirle uniformemente lungo il blocco riscaldante per PCR.
12. Chiudere il coperchio del termociclatore per PCR in tempo reale.
13. Passare a "Funzionamento del sistema per PCR".

Funzionamento del sistema per PCR

NOTA: per usare il file LIMS è necessario che un computer sia connesso al termociclatore.

1. Avviare il software Bio-Rad CFX Manager.
2. Fare clic su **"File"** passare ad "**Apri**" e fare clic su **"Apri file LIMS"**. Dopodiché importare il runfile CFX dal portale Check-Points CTS 2.0 Analysis.

3. Fare clic su **"Avvia"** per avviare il ciclo e salvare la corsa senza modificare il nome del file nel popup.
4. Alla fine del ciclo salvare il file di dati (estensione .PCRD) in un percorso di rete dedicato o su un dispositivo USB.

Elaborazione dei dati e risultati

1. Effettuare l'accesso al portale Check-Points CTS 2.0 Analysis.
2. Aprire la sessione del ciclo generata nella sezione "Generazione dell'elenco di lavoro".
3. Fai clic sul pulsante **"Upload CFX Result file"** e carica il file pcrd contenente i dati della corsa PCR.
4. L'elaborazione dei dati viene eseguita automaticamente in sottofondo e non è necessario tenere aperta la finestra. L'elaborazione richiederà alcuni minuti ed i risultati appariranno automaticamente. Se i risultati non vengono visualizzati, aggiorna il browser una volta (F5) e seleziona la scheda **"Analysis"**.
5. I report possono essere stampati facendo clic sulla scheda **"Report"**. Utilizzare le caselle di spunta per selezionare i risultati per la stampa e usare per scaricare i report singoli o per scaricare un report riepilogativo.
6. La Tabella 1 sottostante mostra i risultati e le interpretazioni conseguibili.

Tabella 1 Interpretazione dei risultati del saggio CTS

Risultato del saggio	Interpretazione del risultato	Passaggio successivo
Serovar di Salmonella	Risultato di serovar e positivo per la Salmonella	Risultato finale
Serovar 1 o serovar 2 di Salmonella	Risultato positivo per la Salmonella con due possibili risultati di serovar	Risultato finale
Genovar positivo per la Salmonella	Risultato positivo per la Salmonella con codice Genovar	Ripetere il campione per una volta con isolato fresco
Positivo per la Salmonella, risultato di tipizzazione non conclusivo	Positivo per la Salmonella, ma nessun risultato di tipizzazione	Ripetere il campione per una volta con isolato fresco
Assenza di Salmonella	Rilevati batteri gram-negativi ma non Salmonella	Risultato finale
Nessun DNA rilevato	Non sono stati rilevati batteri gram-negativi	Ripetere il campione per una volta con isolato fresco
Reazione non OK	Reazione non riuscita - campione inibitorio o problema del reagente; nessuna amplificazione del controllo interno	Ripetere il campione per una volta con isolato fresco

Ripetizione della procedura

Nelle seguenti circostanze si consiglia di ripetere il campione per una volta con un isolato fresco:

- Positivo per la Salmonella con codice genovar
- Positivo per la Salmonella con risultato di tipizzazione non conclusivo
- Nessun DNA rilevato
- Reazione non OK

Un risultato positivo per la Salmonella con codice genovar o di tipizzazione non conclusivo potrebbe essere ottenuto nel caso in cui uno (1) dei 21 marcatori di tipizzazione ha fornito un risultato erroneo generando un codice genovar, per il quale non è presente alcuna associazione con un serovar noto nel database del CTS 2.0. Si tratta di un evento raro per i marcatori singoli, ma significativo per la somma dei 21 marcatori di tipizzazione. Ripetendo il campione per una volta si otterrà un risultato serovar se si è verificato questo problema specifico, che deve essere notificato come risultato finale. Il risultato iniziale di codice genovar o di tipizzazione non conclusivo potrebbe anche essere il risultato corretto e, in questi casi, ripetendo il saggio si otterrà lo stesso risultato.

Anche qualora si ottenga un risultato "Reazione non OK" e "Nessun DNA rilevato" si consiglia di ripetere il campione per una volta con un isolato fresco. Questi risultati sono spesso causati da condizioni di reazione subottimali e/o da impurità nel campione. In molti casi, ripetendo la reazione con un isolato fresco si otterrà un risultato corretto la seconda volta.

Può accadere che il saggio Check&Trace Salmonella 2.0 non generi una conferma e/o un risultato di tipizzazione conclusiva/o neanche dopo la ripetizione del test. In tal caso, si consiglia di ricorrere a un metodo alternativo per ottenere un risultato finale del test (1,2).

Richiesta di support

È possibile richiedere supporto sui risultati ottenuti selezionando il pulsante di supporto nella sessione Esegui.

1. Seleziona la sessione di corsa per la quale desideri richiedere supporto
2. Selezionare l'icona "persona".
3. Fare clic su conferma nel popup

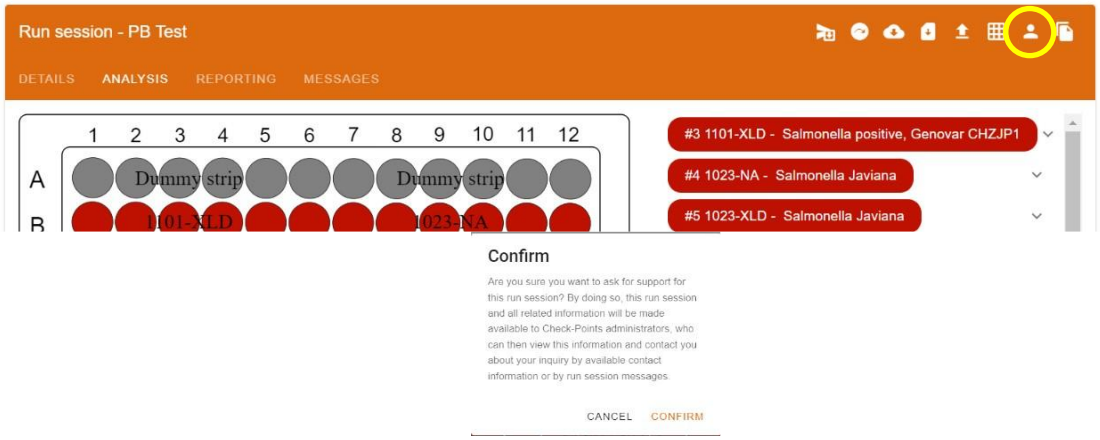


Figure 3 Immagine che mostra l'icona della richiesta di supporto "persona" (cerchio giallo) e il popup dopo aver fatto clic.

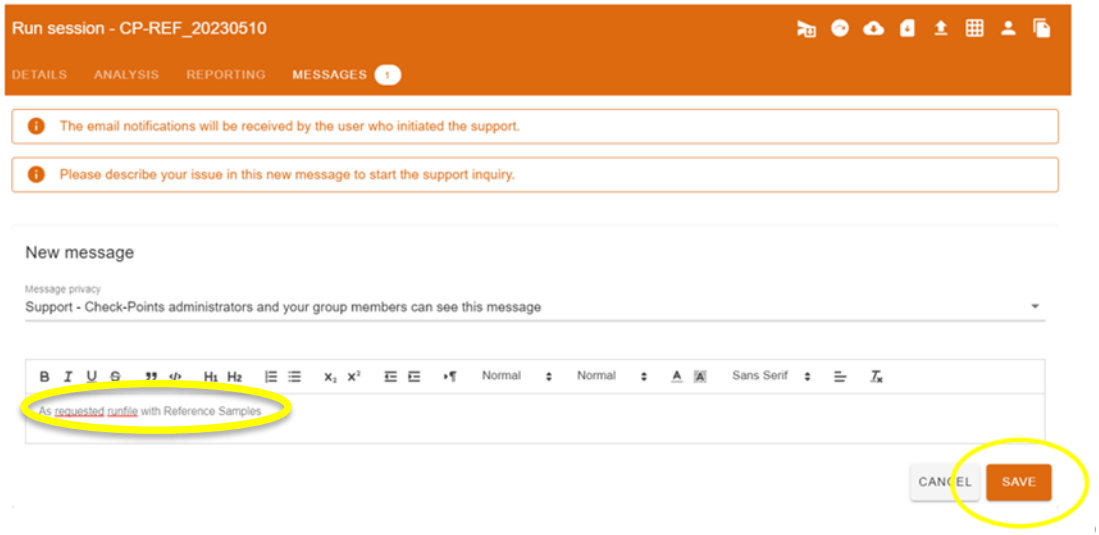


Figure 4 Centro messaggi dopo aver fatto clic sul pulsante di support

4. Aggiungi un messaggio descrittivo in modo che il supporto sappia dove aiutare. Fare clic su Salva per finalizzare.
5. L'aggiunta di un messaggio è obbligatoria, altrimenti la richiesta di supporto non verrà inviata dal sistema.

7 CONTROLLO QUALITÀ

Le procedure di controllo qualità consentono di monitorare le prestazioni del saggio. Al fine di monitorare l'intero processo analitico, i laboratori devono stabilire il numero, il tipo e la frequenza dei test dei materiali di controllo attenendosi alle linee guida o ai requisiti dei regolamenti locali, provinciali, statali e/o federali o degli enti di accreditamento.

I controlli esterni positivi e negativi non vengono usati dal saggio CTS 2.0 ai fini dell'interpretazione dei risultati del test. Inoltre, il saggio CTS 2.0 dispone di un totale di 6 controlli interni per monitorare un potenziale insuccesso della reazione. Tuttavia, si consiglia di testare i campioni di controllo quotidianamente fino ad ottenere un'adeguata convalida del processo. Un'eventuale frequenza minore dei test di controllo deve essere in linea con le raccomandazioni applicabili.

I controlli esterni devono generare i risultati previsti: "Serovar di Salmonella" per il controllo positivo esterno e "Assenza di Salmonella" per il controllo negativo esterno. Qualsiasi altro risultato per i controlli esterni indica un fallimento del sistema.

La Tabella 2 sotto specifica un numero di ceppi di riferimento che potrebbero essere usati come controlli esterni positivi o negativi. Possono essere usati anche altri ceppi di controllo di cui si disponga di un risultato del test ben documentato.

Tabella 2 Ceppi disponibili in commercio per il controllo esterno positivo e negativo

Ceppo di controllo esterno	**Risultato del test**
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis (NCTC 12694)	Salmonella Enteritidis
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium (NCTC 10413)	Salmonella Typhimurium
Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium (monofasica); I 4,5,12:i:- (NCTC 13952)	Salmonella Typhimurium monofasica
Escherichia coli (ATCC 25922)	Assenza di Salmonella

8 LIMITI DELLA PROCEDURA

- Questo prodotto può essere usato solo sul sistema Bio-Rad CFX-96 o CFX Opus 96.
- Risultati erronei possono essere causati da procedure scorrette di raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni, nonché da errori tecnici e scambi di campioni.
- Se il risultato offerto da CTS 2.0 è "Positivo per la *Salmonella* con codice genovar", "Positivo per la *Salmonella*, risultato di tipizzazione non conclusivo", "Nessun DNA rilevato" o "Reazione non OK", il test deve essere ripetuto con un isolato fresco.
- I seguenti 59 sierotipi di Salmonella sono stati validati secondo la norma ISO-16140 parte 6 e sono ufficialmente certificati da MicroVal ed AOAC: Abaetetuba, Agona, Alachua, Albany, Anatum, Bovismorbificans, Braenderup, Brandenburg, Bredeney, Cerro, Choleraesuis, Corvallis, Cubana, Derby, Dublin, Enteritidis, Gallinarum Gallinarum, Gallinarum Pullorum, Give, Goldcoast, Hadar, Havana, Heidelberg, Idikan, Infantis, Javiana, Kentucky, Livingstone, London, Mbandaka, Minnesota, Molade, Montevideo, Muenchen, Muenster, Newport, Ohio, Oranienburg, Orion, Ouakam, Panama, Paratyphi B biovar. Java, Poona, Reading, Rissen, Saintpaul, Sandiego, Schwarzengrund, Senftenberg, Stanley, Tennessee, Thompson, Typhimurium, Uganda, Virchow, Worthington, Yoruba, variante monofasica di Salmonella Typhimurium (1,4,[5],12:i:-), 4,[5],12:d:-.
- I seguenti 48 sierotipi di Salmonella sono stati validati secondo la norma ISO-16140 parte 6, ma la certificazione da parte di MicroVal ed AOAC non è ancora conclusa: *Aberdeen, Abortusovis, Adelaide, Agama, Altona, Amsterdam, Banana, Bareilly, Berta, Blockey, Bracknell, Chester, Chailey, Eastbourne, Emek, Fresno, Gaminara, Gloucester, Haifa, Hartford, Hvittingfoss, Indiana, Isangi, Jerusalem, Johannesburg, Kapemba, Kedougou, Kiambu, Kingston, Kottbus, Lexington, Liverpool, Litchfield, Llandoff, Manhattan, Meleagridis, Nottingham, Offa, Ordonez, Putten, Ruiru, Salmonella Bongori, Soerenga, Taksony, Urbana, Weltevreden, 47:z4,z23:-, 4,12:i:- (not Typhimurium).*
- I sierotipi di Salmonella diversi dai 59 + 48 tipi sopra indicati produrranno un codice genovar. In alcuni casi, CTS 2.0 potrebbe riportare "Salmonella positive serovar A or serovar B" (Positivo Salmonella sierotipo A o sierotipo B).

- Mutazioni o polimorfismi nelle regioni di legame con primer o sonde possono influenzare la rilevazione di alcune varianti di sequenza (tipo di sequenza) dei serovar inclusi nel saggio CTS 2.0. In tali casi, CTS 2.0 riporterà un codice genovar anziché il risultato del serovar.
- CTS 2.0 è in grado di distinguere tra Salmonella enterica e Salmonella bongori, ma non tra le varie sottospecie enterica arizonae, diarizonae, enterica, houtenae, indica e salamae. In tutti questi casi il risultato CTS 2.0 sarà "Salmonella positive genovar code" (Positivo Salmonella codice genovar).
- Il CTS 2.0 è un test qualitativo e non fornisce valori quantitativi né indica la quantità di organismi presenti.
- Le prestazioni del CTS 2.0 sono state valutate su agar nutriente e agar XLD. Altri terreni dovranno essere valutati separatamente dai laboratori per verificare le adeguate prestazioni su tali terreni.

9 CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

Generali

La convalida del saggio CTS 2.0 è stata eseguita da Microval Expert Laboratory WFC, Arkel, Paesi Bassi, sotto la supervisione del Microval Technical Committee (MVTC). Lo standard usato per la stesura del protocollo e la redazione del report, comprensivo dei criteri di accettabilità, è la parte 6 dell'ISO-16140. Per la conferma e la tipizzazione sono stati usati come metodi di riferimento, rispettivamente, l'ISO-6579/1 e l'ISO-6579/3. La convalida del saggio si è articolata in due parti principali: 1. Uno studio di confronto dei metodi (Methods Comparison Study, MCS) e 2. Uno studio interlaboratorio (Inter-Laboratory Study, ILS). L'MCS è stato eseguito mediante batteri provenienti da due terreni: agar nutriente (NA) e agar XLD (XLD) su due piattaforme PCR in tempo reale: Bio-Rad CFX 96 e Bio-Rad CFX Opus 96. L'ILS è stato eseguito su un solo terreno, il XLD, e utilizzando il Bio-Rad CFX 96 o il Bio-Rad CFX Opus 96, a seconda di quello che era disponibile nei vari centri coinvolti nell'ILS.

Studio di conferma dell'inclusività

È stato eseguito uno studio di inclusività per la conferma di *Salmonella* secondo la norma ISO-16140_6. È stato usato un totale di 150 ceppi di *Salmonella* precedentemente caratterizzati. La Tabella 3 sottostante illustra i risultati per la conferma di *Salmonella* da questi ceppi.

Tabella 3 Risultati di 150 ceppi di Salmonella per la relativa conferma, ovvero risultato equivalente a "Serovar di Salmonella", "Genovar di Salmonella" o "Positivo per la Salmonella, risultato di tipizzazione non conclusivo" su due terreni: agar nutriente (NA) e agar XLD, e mediante due piattaforme per PCR, Bio-Rad CFX 96 e Bio-Rad CFX Opus 96.

Numero di ceppi	Sistema qPCR	Terreno	Concordanza per l'inclusività	Discordanza per l'inclusività
150	Bio-Rad CFX 96	NA	150	0
		XLD	150	0
	Bio-Rad CFX OPUS 96	NA	150	0
		XLD	150	0

In sintesi, tutti i 150 ceppi di *Salmonella* sono stati confermati come tali dal saggio CTS 2.0 su entrambi i sistemi e con entrambi i terreni.

Studio di conferma dell'esclusività

È stato eseguito uno studio di esclusività per la conferma di non *Salmonella* secondo la norma ISO-16140_6. È stato usato un totale di 102 ceppi di non *Salmonella* precedentemente caratterizzati. La Tabella 4 sottostante illustra i risultati per la conferma di non *Salmonella* da questi ceppi.

Tabella 4 Risultati di 102 ceppi di Salmonella per la conferma di non Salmonella, ovvero risultato equivalente a "Assenza di Salmonella" su due terreni: agar nutriente (NA) e agar XLD e mediante due

piattaforme per PCR, Bio-Rad CFX 96 e Bio-Rad CFX Opus 96. Nota: i numeri possono variare leggermente in caso di non crescita sul XLD

Numero di ceppi	Sistema qPCR	Terreno	Concordanza per l'esclusività	Discordanza per l'esclusività
102	Bio-Rad CFX 96	NA	102	0
		XLD	95	0
	Bio-Rad CFX OPUS 96	NA	101	0
		XLD	96	0

In sintesi, tutti i ceppi di non *Salmonella* con un risultato di test conclusivo sono stati confermati come tali dal saggio CTS 2.0 su entrambi i sistemi e con entrambi i terreni.

Studio di inclusività per la tipizzazione

È stato eseguito uno studio di inclusività per la tipizzazione di *Salmonella* secondo la norma ISO-16140_6. È stato usato un totale di 315 ceppi di *Salmonella* precedentemente caratterizzati di 59 serovar diversi. La Tabella 5 sottostante illustra i risultati per la tipizzazione di *Salmonella* da questi ceppi.

Tabella 5 Risultati di 315 ceppi di serovar di Salmonella per la relativa tipizzazione, ovvero risultato equivalente a "Serovar di Salmonella", su due terreni: agar nutriente (NA) e agar XLD, e mediante due piattaforme per PCR, Bio-Rad CFX 96 e Bio-Rad CFX Opus 96. Alcuni ceppi hanno fornito un risultato non conclusivo. Nota: "Genovar di Salmonella" è stato considerato come un risultato di tipizzazione non conclusivo per l'inclusività della tipizzazione.

Numero di ceppi	Sistema qPCR	Terreno	Concordanza per l'inclusività	Discordanza per l'inclusività
315	Bio-Rad CFX 96	NA	311	0
		XLD	300	0
	Bio-Rad CFX OPUS 96	NA	308	1
		XLD	309	1

In sintesi, 1208 su 1210 risultati di test relativi al serovar di *Salmonella* erano concordanti con i risultati attesi per il test. Due (2) risultati di test relativi al serovar di *Salmonella* erano in disaccordo con i risultati previsti, un ceppo di Salmonella Poona è stato notificato come Salmonella Abaetetuba con il sistema CFX Opus 96 su entrambi i terreni.

Studio di esclusività per la tipizzazione

È stato eseguito uno studio di esclusività per la tipizzazione di *Salmonella* secondo la norma ISO-16140_6. È stato usato un totale di 104 ceppi, 78 serovar per l'esclusività di *Salmonella* e 26 non *Salmonella Enterobacteriaceae*. La Tabella 6 sottostante illustra i risultati dei test per questi ceppi.

Tabella 6 Risultati combinati dei test per 78 ceppi per l'esclusività di serovar di Salmonella e 26 ceppi non Salmonella Enterobacteriaceae su due terreni: agar nutriente (NA) e agar XLD, e mediante due piattaforme per PCR, Bio-Rad CFX 96 e Bio-Rad CFX Opus 96. Alcuni ceppi hanno fornito un risultato non conclusivo. Nota: i serovar per l'esclusività di Salmonella dovrebbero fornire risultati di genovar per la "Concordanza di esclusività".

Numero di ceppi	Sistema qPCR	Terreno	Concordanza per l'esclusività	Discordanza per l'esclusività
104	Bio-Rad CFX 96	NA	103	1
		XLD	102	0
	Bio-Rad CFX OPUS 96	NA	101	2
		XLD	102	1

In sintesi, 408 risultati di test su 412 erano concordanti con il risultato previsto, "Genovar di Salmonella" per i serovar di *Salmonella* per l'esclusività e "Assenza di *Salmonella*" per i non *Salmonella Enterobacteriaceae*. 4 serovar per l'esclusività di *Salmonella* hanno fornito un risultato errato, ovvero "Serovar di *Salmonella*" invece di "Genovar di *Salmonella*". Salmonella Coeln ha fatto registrare il risultato "Salmonella Saintpaul" sul NA con entrambi i sistemi per PCR. Salmonella Matopeni ha fatto registrare il risultato "Salmonella Braenderup" sul CFX Opus 96 con entrambi i terreni.

Studio interlaboratorio

30 ceppi batterici sono stati inviati a 15 collaboratori presso 13 centri partecipanti allo studio interlaboratorio (ILS). Sono stati inclusi 16 serovar per l'inclusività di *Salmonella*, 4 serovar per l'esclusività di *Salmonella*, un (1) *Salmonella enterica subsp. arizonae*, un (1) *Salmonella bongori* e 8 non-*Salmonella Enterobacteriaceae*. 24 risultati di test su 30 sono stati usati per lo studio di conferma ILS e un'altra serie di 24 risultati su 30 è stata usata per lo studio di tipizzazione ILS, quindi è stata usata una serie di 18 risultati di test sia per la tipizzazione che per la conferma. Il test di riferimento è stato eseguito solo per la parte di conferma dello studio. Il test è stato eseguito mediante il solo terreno agar XLD usando i sistemi PCR a disposizione dei collaboratori, ovvero 11 sistemi Bio-Rad CFX 96 e 4 sistemi Bio-Rad CFX Opus 96.

Studio di conferma ILS

Nell'ILS sono stati inclusi i dati di 13 collaboratori su 15, un collaboratore non ha riportato i dati in tempo e l'altro non ha rispettato le istruzioni per l'uso (Instructions For Use, IFU). La Tabella 7 sottostante illustra i risultati dello studio di conferma ILS per questi 13 collaboratori.

Tabella 7 Risultati dei test per la conferma ILS, 16 ceppi per l'inclusività e 8 ceppi per l'esclusività, tutti non Salmonella Enterobacteriaceae.

Collaboratore	Conferma inclusività		Conferma esclusività	
	Metodo di riferimento	CTS 2.0	Metodo di riferimento	CTS 2.0
1	16/16	15/16	8/8	8/8
2	16/16	16/16	8/8	8/8
3	16/16	16/16	7/8	8/8
4	16/16	16/16	8/8	8/8
5	16/16	16/16	8/8	8/8
6	16/16	16/16	8/8	8/8
7	16/16	16/16	8/8	8/8
8	16/16	15/16	7/8	8/8
9	16/16	16/16	8/8	8/8
10	16/16	16/16	8/8	8/8
11	16/16	16/16	8/8	8/8
12	16/16	16/16	8/8	8/8
13	16/16	16/16	8/8	8/8
Totale	**208/208**	**206/208**	**102/104**	**104/104**

In sintesi, 310 su 312 risultati di test per la conferma di CTS 2.0 erano concordanti. Due (2) campioni su 312 non hanno fornito un risultato conclusivo. Non sono stati segnalati risultati di test discordanti.

Studio di tipizzazione ILS

Nell'ILS sono stati inclusi i dati di 13 collaboratori su 15, un collaboratore non ha riportato i dati in tempo e l'altro non ha rispettato le istruzioni per l'uso (IFU). LaTabella 8 sottostante illustra i risultati dello studio di tipizzazione ILS per questi 13 collaboratori.

Tabella 8 Risultati dei test per la tipizzazione, 16 ceppi per l'inclusività e 8 ceppi per l'esclusività, ovvero 4 serovar per l'esclusività di Salmonella e 4 non Salmonella Enterobacteriaceae.

Collaboratore	Inclusività per la tipizzazione		Esclusività per la tipizzazione	
	Metodo di riferimento	CTS 2.0	Metodo di riferimento	CTS 2.0
1	NA	15/16	NA	8/8
2	NA	16/16	NA	8/8
3	NA	16/16	NA	7/8
4	NA	16/16	NA	8/8
5	NA	14/16	NA	8/8
6	NA	16/16	NA	8/8
7	NA	16/16	NA	8/8
8	NA	14/16	NA	8/8
9	NA	16/16	NA	8/8
10	NA	16/16	NA	8/8
11	NA	16/16	NA	8/8
12	NA	16/16	NA	8/8
13	NA	16/16	NA	8/8
Totale	**NA**	**203/208**	**NA**	**103/104**

In sintesi, 306 su 312 risultati di test per la tipizzazione di CTS 2.0 erano concordanti. Sei (6) campioni su 312 non hanno fornito un risultato conclusivo. Non sono stati segnalati risultati di test discordanti.

Sintesi del certificato MicroVal

Con la presente, MicroVal dichiara che la valutazione di certificazione ha dimostrato che Check & Trace Salmonella 2.0 (CTS 2.0) è stato convalidato e ha dimostrato di essere per lo meno equivalente al metodo di riferimento come dimostrato dal report dello studio di convalida. La sintesi del report di convalida è disponibile sul sito di MicroVal: www.microval.org

Metodi di riferimento: ISO-6579-1:2017 e ISO/TR 6579-3:2014.

Ambito: Conferma di presunti isolati di *Salmonella* su terreno agar XLD selettivo e NA non selettivo e tipizzazione di 59 serovar di Salmonella.

La convalida e la certificazione sono state eseguite secondo la norma ISO 16140-6:2019 e lo Schema per la certificazione e le regole di MicroVal versione 9.1.

Certificato n.: 2021LR07

Certificato AOAC

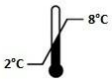
Check & Trace Salmonella 2.0 è stato certificato dal programma AOAC Performance Tested Methods (SM) il 10 luglio 2023 e gli è stata assegnata la certificazione PTM n. 072301. La valutazione ha incluso test di inclusività, esclusività, robustezza, coerenza del prodotto e stabilità. Il CTS 2.0 è applicabile per la conferma delle specie Salmonella da agar NA non selettivo e XLD selettivo e per la tipizzazione dei 59 sierotipi di Salmonella menzionati nel paragrafo 8 (limitazioni della procedura) del presente manuale. La sintesi del rapporto è reperibile tramite:

https://members.aoac.org/AOAC/PTM_Validated_Methods.aspx

10 RIFERIMENTI

1. ISO 6579-1. Microbiologia della catena alimentare - Metodo orizzontale per la ricerca, la conta e la sierotipizzazione di *Salmonella* - Parte 1: Rilevamento di Salmonella spp. [ISO 6579-1:2017].
2. ISO 6579-3. Microbiologia della catena alimentare - Metodo orizzontale per la ricerca, la conta e la sierotipizzazione di *Salmonella* - Parte 3: Linee guida per la sierotipizzazione di Salmonella spp. [ISO 6579-3:2014].
3. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. Grimont, P.A.D. and Weill, F.X. Vol.9, 2007.
4. ISO 16140-1:2016 Microbiologia della catena alimentare - Validazione di un metodo - Parte 1: Vocabolario.
5. ISO 16140-6:2016 Microbiologia della catena alimentare - Validazione di un metodo - Parte 6: Protocollo per la validazione di metodi (proprietari) alternavi per la conferma microbiologica e procedure di tipizzazione.

11 GLOSSARIO DEI SIMBOLI

Simbolo	Significato
	Produttore
	Contenuto sufficiente per <n> test
	Limite di temperatura
	Consultare le istruzioni per l'uso Per le istruzioni per l'uso elettroniche, il simbolo è corredato dall'URL.
	Mantenere all'asciutto
	Tenere lontano dalla luce

Check-Points B.V.
Binnenhaven 5
6709 PD Wageningen
Paesi Bassi

info@check-points.com
www.check-points.com