



IZSAM G. CAPOREALE
TERAMO



Brucellosi

Centro di Referenza Nazionale

Ricerca di *Brucella* sp in matrici alimentari e organi: circuiti interlaboratorio 2013-2014

Katuscia Zilli - Batteriologia e Igiene delle produzioni Lattiero-casearie - IZS A&M

27/02/2015



Prove interlaboratorio Brucellosi

 Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

L'IZSAM, in qualità di Centro di Referenza Nazionale per le Brucellosi, ha organizzato per gli anni 2013 e 2014 ring tests per la ricerca di *Brucella* sp in matrici alimentari e organi.

2013

RT *Brucella*
diagnostica

Matrice
milza



RT *Brucella*
alimenti

Matrice
ricotta



2014

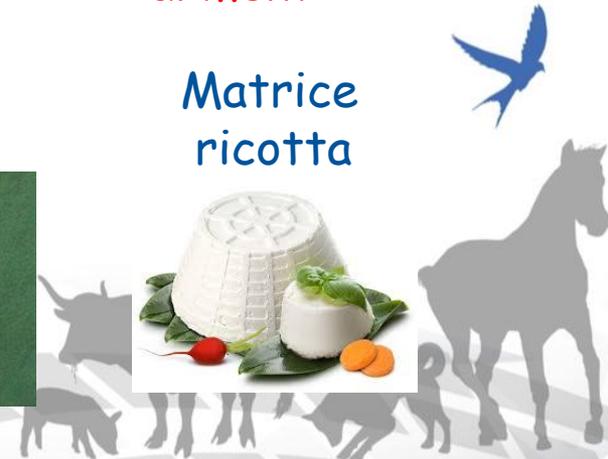
RT *Brucella*
diagnostica

Matrice
linfonodi



RT *Brucella*
alimenti

Matrice
ricotta

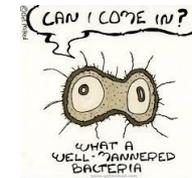


Preparazione dei campioni RT Brucella alimenti 2013-2014

La ricotta è stata acquistata e
contaminata con due diverse
concentrazioni di Brucella suis
biotipo 2



Carica alta
L1 10^4



Carica bassa
L1 10^2





IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

 Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Preparazione dei campioni RT Brucella alimenti

**Ad ogni laboratorio partecipante è stato inviato un set di 15
campioni contenenti 10 g di ricotta**

5 campioni
contaminati
con carica L1

5 campioni contaminati con
batteri non appartenente al
genere Brucella

5 campioni
contaminati
con carica L2



**I campioni dopo contaminazione sono
stati spediti in condizioni di
refrigerazione (ghiaccio secco)**





IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

 Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Controllo stabilità ed omogeneità dei campioni

Lo stesso giorno dell'invio, e per le 6 settimane successive, su 10 campioni scelti a caso (sia per la carica bassa che per la carica alta) è stata valutata l'omogeneità e stabilità processando i campioni secondo il metodo d'isolamento descritto dal manuale OIE

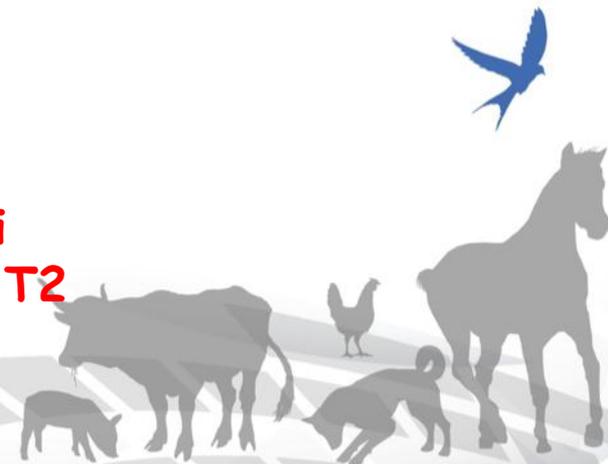


Omogeneità campioni 2013



L'omogeneità dei campioni è stata determinata valutando i livelli di contaminazione di 10 campioni per i due lotti L1 ed L2, nei diversi istanti di tempo

I dati sono stati valutati
statisticamente con il test T₂
di Cochran

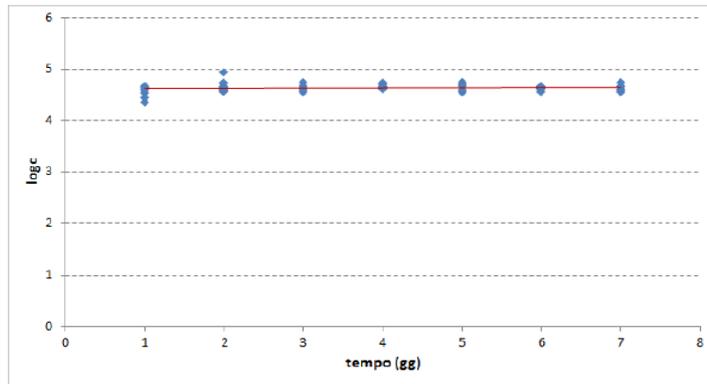


Stabilità campioni 2013

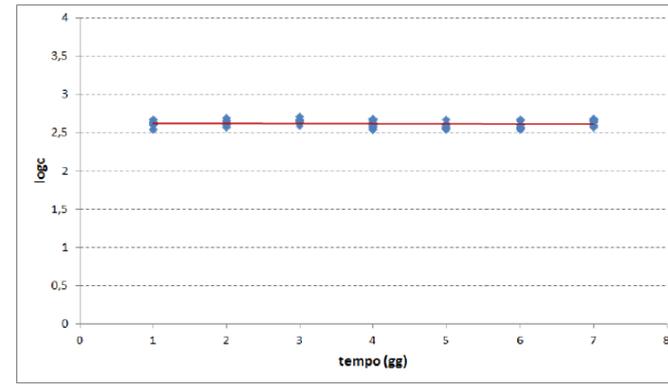
Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

La stabilità dei campioni è stata determinata valutando la carica dei due livelli di contaminazione ad intervalli di tempo regolari (dalla prima alla settima settimana). Per ogni intervallo di tempo sono stati esaminati 10 campioni per ciascun lotto L1 e L2.

Stabilità lotto L1

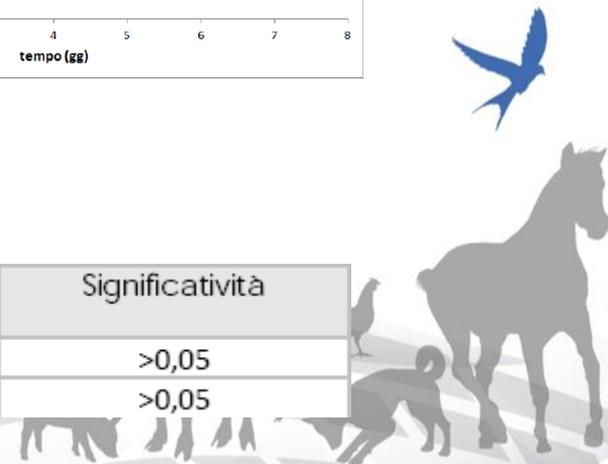


Stabilità lotto L2



Retta di regressione

Lotto	Equazione	Valore di t coefficiente angolare	Significatività
Alta carica	$4,620+0,004*\text{tempo}$	0,874	>0,05
Bassa carica	$2,630-0,002*\text{tempo}$	-0,851	>0,05



Omogeneità campioni 2014

L'omogeneità dei campioni è stata determinata valutando i livelli di contaminazione di 10 campioni per i due lotti L1 ed L2, nei diversi istanti di tempo

Omogeneità carica L2

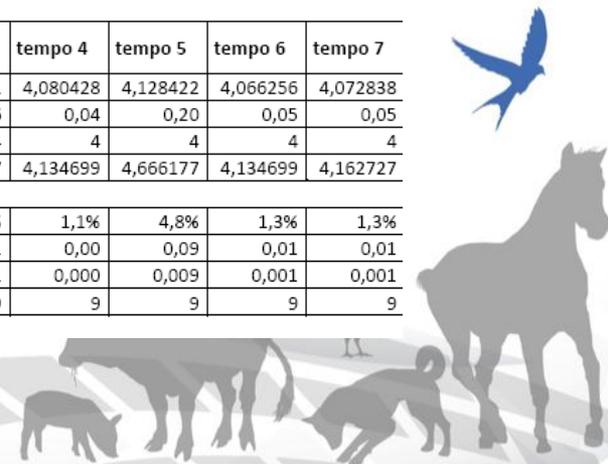
	tempo 1	tempo 2	tempo 3	tempo 4	tempo 5	tempo 6	tempo 7
media	2,085445	2,066434	2,114211	2,085251	2,083009	2,089224	2,098721
dev.st	0,06	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05
min	2	2	2	2	2	2	2
max	2,162727	2,134699	2,162727	2,162727	2,162727	2,162727	2,162727

CV	2,8%	2,5%	2,5%	2,9%	2,5%	2,6%	2,5%
T2	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01
variation between samples	0,002	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001
g.d.l	9	9	9	9	9	9	9

Omogeneità carica L1

	tempo 1	tempo 2	tempo 3	tempo 4	tempo 5	tempo 6	tempo 7
media	4,079053	4,092027	4,069281	4,080428	4,128422	4,066256	4,072838
dev.st	0,06	0,06	0,06	0,04	0,20	0,05	0,05
min	4	4	4	4	4	4	4
max	4,162727	4,162727	4,162727	4,134699	4,666177	4,134699	4,162727

CV	1,4%	1,4%	1,4%	1,1%	4,8%	1,3%	1,3%
T2	0,01	0,01	0,01	0,00	0,09	0,01	0,01
variation between samples	0,001	0,001	0,001	0,000	0,009	0,001	0,001
g.d.l	9	9	9	9	9	9	9

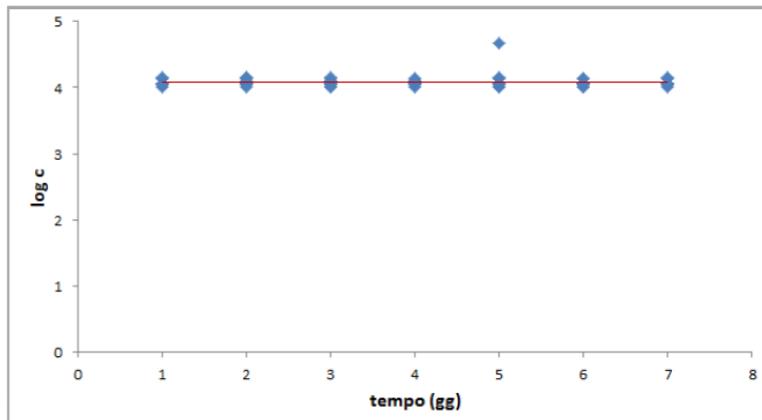


Stabilità campioni 2014

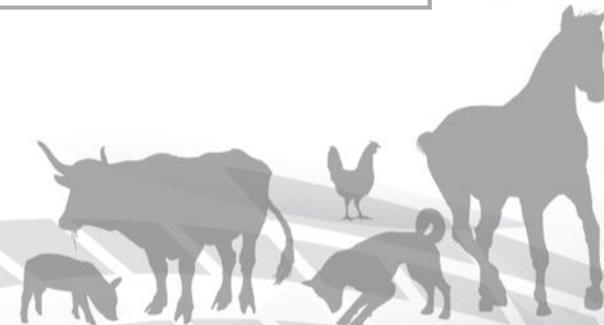
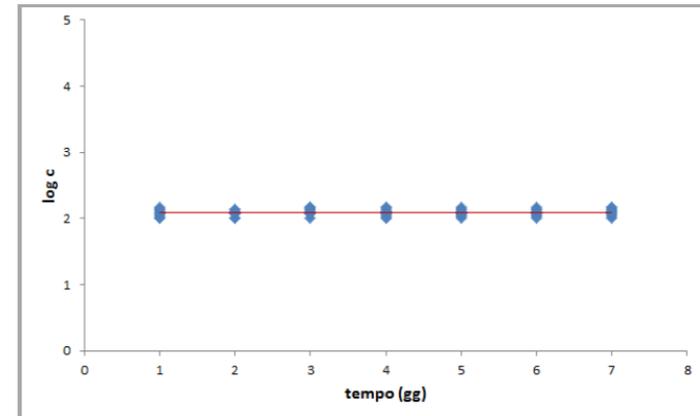
 Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

La stabilità dei campioni è stata determinata valutando la carica dei due livelli di contaminazione ad intervalli di tempo regolari (dalla prima alla settima settimana). Per ogni intervallo di tempo sono stati esaminati 10 campioni per ciascun lotto L1 e L2.

Stabilità L1



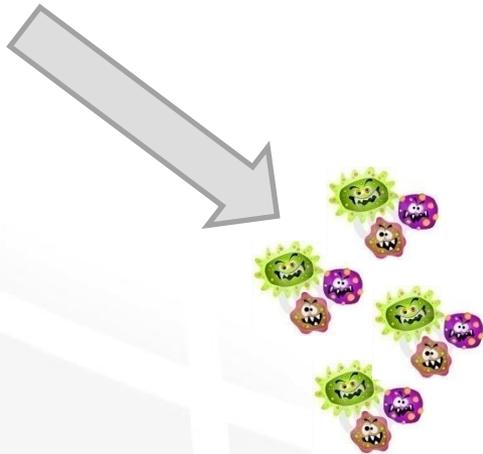
Stabilità L 2



Preparazione dei campioni RT Brucella diagnostica 2013

I campioni impiegati sono stati ottenuti contaminando milza di suino proveniente da un allevamento ufficialmente indenne per Brucellosi con *Brucella suis* biotipo 2, con due diversi livelli di concentrazione.

Carica alta
L1 10^4



Carica bassa
L1 10^2





IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

 Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Preparazione dei campioni RT Brucella diagnostica 2013

Ad ogni laboratorio partecipante è stato inviato un set di 15 campioni

5 campioni
contaminati
con carica L1

5 campioni contaminati con
batteri non appartenente al
genere Brucella (E. coli, P.
aeruginosa)

5 campioni
contaminati
con carica L2



**I campioni dopo contaminazione sono
stati spediti in condizioni di
refrigerazione (ghiaccio secco)**



Omogeneità campioni RT Brucella diagnostica 2013

L'omogeneità dei campioni è stata determinata valutando i livelli di contaminazione di 12 campioni per ogni lotto L1 e L2. I risultati sono stati valutati statisticamente con il test T2 di Cochran. Come descritto nelle tabelle, i lotti L1 e L2 sono risultati omogenei per tutto il periodo considerato

Omogeneità carica bassa L 2

T2 Cochran test for outlying variance

Valore statistica test	Gradi di libertà	p-value
16,897	11	0,111

Il lotto risulta omogeneo.

Omogeneità carica alta L1

T2 Cochran test for outlying variance

Valore statistica test	Gradi di libertà	p-value
18,826	11	0,064

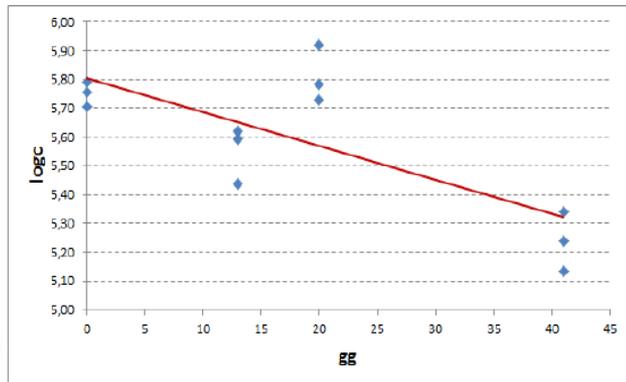
Il lotto risulta omogeneo.



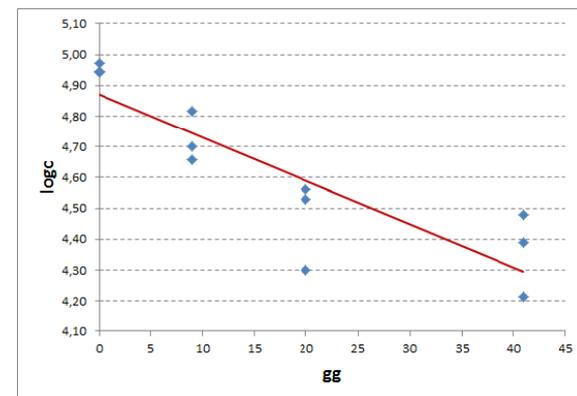
Stabilità campioni RT Brucella diagnostica 2013

La stabilità dei campioni è stata determinata valutando i livelli di contaminazione dei due lotti L1 e L2, ad intervalli di tempo regolari (0, 9, 20 e 42 giorni). Per ogni intervallo di tempo sono stati esaminati 3 campioni per un totale complessivo di 12 per ogni lotto

Carica alta L1



Carica bassa L 2



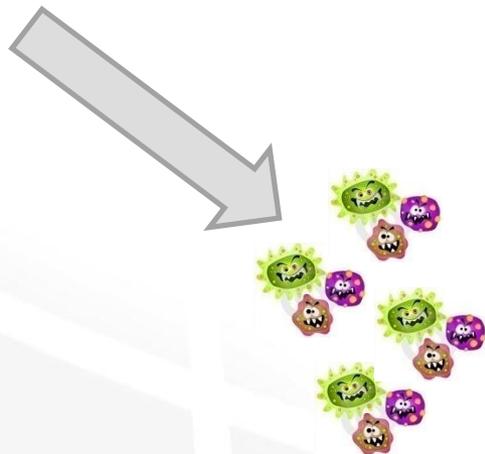
Retta di regressione

Lotto	Equazione	Valore di t coefficiente angolare	Significatività
1	$4,87-0,014*t$	-5,689	<0,05
2	$5,81-0,012*t$	-3,505	<0,05

Preparazione dei campioni RT Brucella diagnostica 2014

I campioni impiegati sono stati ottenuti contaminando linfonodi ovini proveniente da allevamenti ufficialmente indenne per Brucellosi con *Brucella suis* biotipo 2, con due diversi livelli di concentrazione.

Carica alta
 $L1\ 10^4$



Carica bassa
 $L1\ 10^2$





IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

 Brucellosi
Centro di Referenza Nazionale

Preparazione dei campioni RT Brucella diagnostica 2014

Ad ogni laboratorio partecipante è stato inviato un set di 15 campioni

5 campioni
contaminati
con carica L1

5 campioni contaminati con
batteri non appartenente al
genere Brucella (E. coli, P.
aeruginosa)

5 campioni
contaminati
con carica L2

**I campioni dopo contaminazione sono
stati spediti in condizioni di
refrigerazione (ghiaccio secco)**



Omogeneità campioni RT Brucella diagnostica 2014

L'omogeneità dei campioni è stata determinata valutando i livelli di contaminazione di 10 campioni, ogni 10 giorni, per 6 istanti di tempo per i due lotti L1 ed L2. I dati ottenuti sono stati analizzati con il test T2 di Cochran.

Carica bassa L 2

tempo	Valore statistica test	Gradi di libertà	p-value
0	0,02	9	>0,05
1	0,01	9	>0,05
2	0,03	9	>0,05
3	0,02	9	>0,05
4	0,01	9	>0,05
5	0,01	9	>0,05

Carica alta L 1

tempo	Valore statistica test	Gradi di libertà	p-value
0	0,01	9	>0,05
1	0,02	9	>0,05
2	0,02	9	>0,05
3	0,01	9	>0,05
4	0,01	9	>0,05
5	0,01	9	>0,05

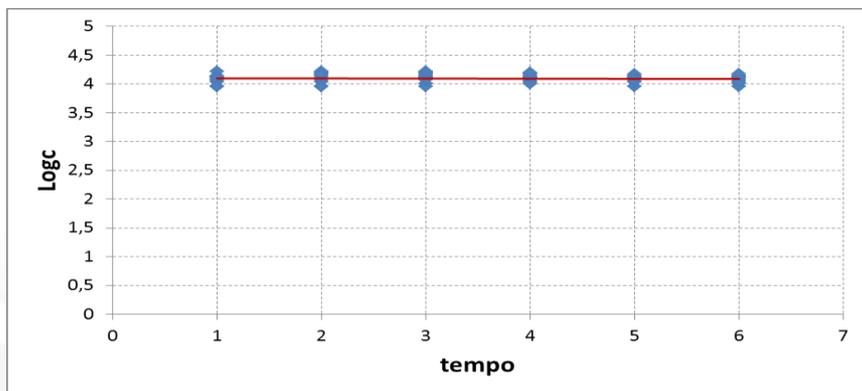
I lotti L1 e L2 sono risultati omogenei per tutto il periodo considerato ($p > 0,05$).



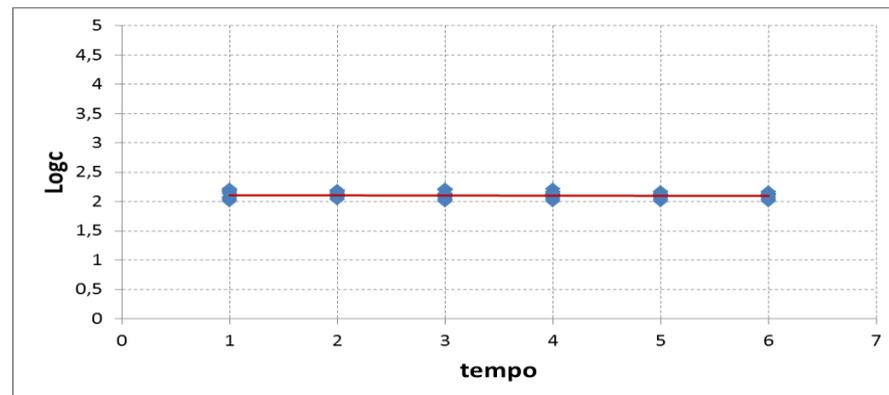
Stabilità campioni RT Brucella diagnostica 2014

La stabilità dei campioni è stata determinata valutando i livelli di contaminazione ad intervalli di tempo regolari (0, 10, 20, 30, 40 e 50 gg). Per ogni intervallo di tempo sono stati esaminati 10 campioni per ciascuno dei 2 lotti L1 e L2.

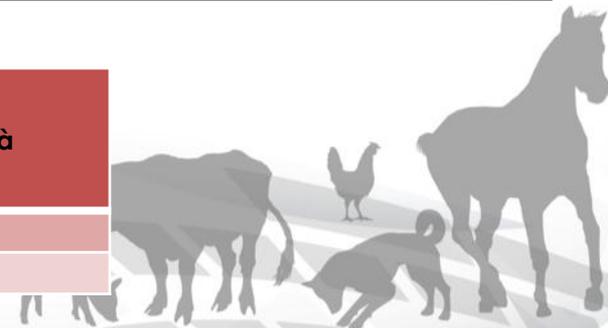
Carica alta L1



Carica bassa L2



Lotto	Equazione	Valore t coefficiente angolare	Significatività
1	2,11-0,003*t†	-0,683	>0,05
2	4,10-0,002*t†	-0,378	>0,05





IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

 **Brucellosi**
Centro di Referenza Nazionale



GRAZIE PER
L'ATTANZIONE

