Laboratorio nazionale di riferimento per Listeria monocytogenes

IZS TE B3.1.9 SOP001

TITOLO: Procedura per l'invio dei ceppi di *Listeria* monocytogenes al Laboratorio nazionale di riferimento

PAG. 1/9 REVISIONE N. 0

### PROCEDURA PER L'INVIO DEI CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* AL LABORATORIO NAZIONALE DI RIFERIMENTO

0	PRIMA EMISSIONE					01.04.2011
REV.	DESCR. REVISIONE	PREPARATA DA	VERIFICATA DAL RESP.	VERIFICATA AQLC	APPROVATA	DATA

Laboratorio nazionale di riferimento per Listeria monocytogenes

IZS TE B3.1.9 SOP001
TITOLO: Procedura per l'invio dei ceppi di *Listeria*monocytogenes al Laboratorio nazionale di
riferimento

PAG. 2/9 REVISIONE N. 0

### 1. CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura si applica per l'invio al Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) di ceppi di *Listeria monocytogenes* per l'esecuzione dei test di identificazione biochimica, sierotipizzazione e PFGE.

#### 2. SCOPO

La presente procedura definisce le responsabilità e le modalità operative per la preparazione e l'invio dei ceppi di *Listeria monocytogenes* al LNR. E' stata redatta allo scopo di garantire che tutte le attività siano svolte in modo uniforme e controllato.

#### 3. TERMINI E DEFINIZIONI

- United Nations (UN) number: sistema numerico di 4 unità che identificano nella lista UN i materiali e le sostanze pericolose. I numeri da UN001 a UN3500 caratterizzano le sostanze pericolose e sono soggette a raccomandazioni nel trasporto:
  - UN 2814: materiale contagioso per l'uomo (categoria A);
  - UN2900: identifica materiale contagioso solo per animali (categoria A);
  - UN3373: sostanze biologiche (categoria B);
  - UN3291: identifica scarti medici o clinici che si sospetta possano contenere o contengono sostanze di categoria B.
- International Civil Aviation Organization/International Air Transport association (ICAO/IATA): codice di quattro lettere, o più raramente due lettere e due cifre, utilizzato per designare gli aeroporti nel mondo. I prefissi nazionali sono composti da due lettere, la prima indica una zona abbastanza vasta, per esempio si utilizza "L" per l'Europa meridionale ed "E" per l'Europa settentrionale. La seconda lettera è in genere l'iniziale della nazione, per cui per esempio l'Italia usa LI.

### 4. RIFERIMENTI

- World Health Organization (WHO/HSE/IHR/2010.8) Guidance on regulations for the Transport of infectious Substances" 2011-2012; pag. 1-29.
- IATA-Infectious Substances Shipping Guidelines-1 January 2006- 7th Edition p. 1-41.
- ADR 2009 "Accordo Europeo relativo al trasporto internazionale stradale di merci pericolose". Classe 6.2: infectious substances". pag.110-116 <a href="http://www.unece.org/trans/danger/publi/adn/adn2009/09files\_e.html">http://www.unece.org/trans/danger/publi/adn/adn2009/09files\_e.html</a>.

### Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"

### Via Campo Boario - 64100 Teramo

Laboratorio nazionale di riferimento per Listeria monocytogenes

IZS TE B3.1.9 SOP001
TITOLO: Procedura per l'invio dei ceppi di *Listeria*monocytogenes al Laboratorio nazionale di
riferimento

PAG. 3/9 REVISIONE N. 0

#### 5. PROCEDURA

### 5.1 Responsabilità

- Il Responsabile del Laboratorio che effettua l'isolamento di *Listeria monocytogenes* ha la responsabilità dell'identificazione, conservazione, confezionamento e invio dei ceppi di *Listeria monocytogenes* al LNR secondo le modalità descritte in questa procedura.
- Il Responsabile del LNR ha la responsabilità della gestione dei ceppi pervenuti. Affida l'esecuzione delle attività descritte a personale tecnico opportunamente addestrato.

### 5.2 Apparecchiature e materiali

- Ago da infissione.
- Anse sterili monouso.
- Congelatore -70°/-80°C.
- Frigorifero 2°/8°C.
- Materiale per la spedizione (sistema a triplo involucro per la spedizione di materiale biologico infetto, etichetta con indicazione del rischio per sostanze infettive).
- Microbank o prodotto equivalente.
- Parafilm o prodotto equivalente.
- Provette sterili.
- Termostato 37°C±1°C.

### 5.3 Terreni

- Agar sangue o Tryptic Soy Agar.
- Terreno di trasporto per ceppi batterici.

La composizione e le modalità di preparazione dei terreni sono riportati al capitolo 6 della presente procedura.

#### 5.4 Modalità operative

### 5.4.1 Numero di ceppi di Listeria monocytogenes da inviare al LNR

Il numero di ceppi da inviare per ciascun campione è in relazione al numero di colonie isolate dal campione. Procedere come di seguito descritto:

- se dal campione esaminato sono state isolate più di 5 colonie, inviarne almeno 3 scelte a caso;
- se dal campione sono state isolate un numero ≤ 5 colonie, inviarle tutte.

I ceppi isolati devono essere preparati per l'invio secondo le modalità riportate al punto 5.4.2. Se il laboratorio procede ad invii periodici, i ceppi in attesa dell'invio dovranno essere conservati secondo le modalità riportate al paragrafo 5.4.3.

#### 5.4.2 Preparazione dei ceppi da inviare

### Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"

### Via Campo Boario - 64100 Teramo

Laboratorio nazionale di riferimento per Listeria monocytogenes

IZS TE B3.1.9 SOP001
TITOLO: Procedura per l'invio dei ceppi di *Listeria*monocytogenes al Laboratorio nazionale di
riferimento

PAG. 4/9 REVISIONE N. 0

I ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati devono essere preparati secondo le seguenti indicazioni:

- Seminare una colonia su una piastra di terreno non selettivo (Agar sangue o Tryptic Soy Agar) e incubare in termostato a 37°±1°C per 18-24 ore.
- Prelevare sterilmente un'ansata abbondante di patina batterica e trasferirla in una provetta a doppia chiusura contenente terreno di trasporto (vedi capitolo 6: "Composizione e modalità di preparazione dei terreni").
- Incubare le provette in termostato a 37°±1°C per 18-24 ore.
- Apporre ad ogni provetta un' etichetta sulla quale dovranno essere indicati i seguenti dati:
  - numero identificativo del ceppo corrispondente al numero assegnato dal sistema SINSA al campione di origine ed riportato sulla "Scheda accompagnamento campioni" (Allegato 1);
  - data di isolamento ceppo;
- Avvolgere la parte superiore delle provette con pellicola plastica tipo "Parafilm" per evitarne l'apertura.

### 5.4.3 Conservazione dei ceppi

I ceppi che non vengono inviati al LNR in breve tempo dopo l'isolamento, dovranno essere conservati a -70°/-80°C utilizzando un sistema con microprovette contenenti microsfere porose e liquido crioprotettivo (Microbank®, Cyrovial®, Vibakstore®, Mast Cryobank® o altro sistema equivalente).

Modalità preparazione microprovette:

- Preparare una coltura fresca del ceppo seminandolo su agar sangue, incubare in termostato a 37 ±1°C per 24-48h.
- Con un'ansa sterile rimuovere dalla piastra contenente il ceppo circa ¼ della patina batterica sviluppata e stemperarla in una microprovetta (non asportare il liquido in cui sono immerse le microsfere).
- Etichettare la microprovetta riportando il numero identificativo del campione di origine.
- Congelare a -70/-80°C.

### 5.4.4 Confezionamento e trasporto del campione

Per le sostanze infettanti di categoria B, alle quali appartiene *Listeria monocytogenes*, si ricorre al confezionamento con triplo involucro per trasporto su strada o per via aerea. L'imballaggio dovrà rispondere ai requisiti P650 e contrassegnato con "UN 3373". Il contenitore primario dovrà essere di buona qualità e resistente agli urti e alle sollecitazioni che si verificano durante il trasporto.

L'imballaggio dovrà essere confezionato e chiuso in modo da evitare versamenti che durante il trasporto possono essere provocati da vibrazioni, variazioni di temperatura, di pressione e di umidità.

Il confezionamento P650 è composto da tre : contenitore primario, contenitore secondario e un contenitore esterno (figura 1). Di questi ultimi due, almeno uno deve essere rigido (per il trasporto aereo devono essere entrambi rigidi).

Laboratorio nazionale di riferimento per Listeria monocytogenes

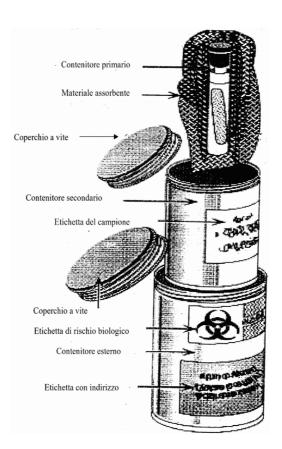
IZS TE B3.1.9 SOP001

TITOLO: Procedura per l'invio dei ceppi di *Listeria*monocytogenes al Laboratorio nazionale di
riferimento

PAG. 5/9 REVISIONE N. 0

Porre materiale assorbente fra i primi due contenitori. Il contenitore primario sarà collocato nel contenitore secondario e questi in un ulteriore contenitore con materiale ammortizzante.

Figura 1: Modalità di confezionamento di materiale biologico



Il pacco dovrà riportare un'etichetta ben visibile con scritto "Sostanze biologiche categoria B", di forma quadrata con angolo di 45°C e lunghezza del lato di almeno 50 mm. La larghezza del lato deve essere almeno di 2 mm e le lettere devono essere alte almeno 6 mm. All'interno del quadrato deve essere riportato il codice "UN 3373" (figura 2).

Laboratorio nazionale di riferimento per Listeria monocytogenes

IZS TE B3.1.9 SOP001
TITOLO: Procedura per l'invio dei ceppi di *Listeria*monocytogenes al Laboratorio nazionale di

riferimento

PAG. 6/9 REVISIONE N. 0

Figura 2: Codice da riportare sull'etichetta per sostanze di categoria B



Il contenitore primario e il secondario devono essere a tenuta stagna. Porre fra il primo e secondo contenitore del materiale assorbente in quantità sufficiente ad assorbire, in caso di rottura, il liquido presente. Utilizzare contenitori primari e secondari presenti in commercio, capaci di resistere ad una pressione differenziale non inferiore a 95 kPa (0,95 bar).

I limiti posti al solo trasporto aereo riguardano la quantità massima contenuta nel contenitore primario, compreso il materiale utilizzato per stabilizzare o prevenire la degradazione del campione. Il volume non deve essere maggiore di 1 litro mentre la quantità massima contenuta nell'intero pacco, compreso il materiale usato per stabilizzare o prevenire la degradazione dei campioni, non deve essere superiore a 4 litri (escluso ghiaccio, ghiaccio secco o azoto liquido utilizzati a protezione del campione).

Nel trasporto refrigerato o congelato se si utilizza ghiaccio o ghiaccio secco, questo dovrà essere posto all'esterno del pacco secondario (o del pacco esterno in caso di un unico pacco grande che includa più pacchi). Internamente dovranno essere posizionati dei supporti per mantenere il contenitore secondario nella posizione originale dopo che il ghiaccio o il ghiaccio secco si saranno dissolti. Se si usa ghiaccio secco, gli altri contenitori dovranno essere a tenuta stagna e dovranno permettere il rilascio di gas  $CO_2$ . Il pacco deve recare l'etichetta "anidride carbonica, solido" o "ghiaccio secco" e un'indicazione che il materiale è usato a scopo diagnostico ("campioni diagnostici congelati").

Quando più pacchi sono riuniti in un unico pacco, tutte le etichette devono essere ripetute anche sul contenitore più esterno.

Ulteriori sostanze pericolose non dovranno essere aggiunte nel pacco a meno che non servano a neutralizzare il pericolo di sostanze infettive. In ogni pacco possono esser messi al massimo 30 ml di sostanze pericolose di classe 3 (liquidi infiammabili), classe 8 (corrosivi) o classe 9 (miscellanea di merci e sostanze pericolose).

Nel caso di trasporto aereo, su ogni pacco dovranno essere riportati nome e indirizzo del mittente e del destinatario e il contenitore primario e secondario dovrà resistere a variazioni di temperatura compresa fra -40°C e +55°C.

Laboratorio nazionale di riferimento per Listeria monocytogenes

IZS TE B3.1.9 SOP001 TITOLO: Procedura per l'invio dei ceppi di *Listeria* monocytogenes al Laboratorio nazionale di riferimento PAG. 7/9 REVISIONE N. 0

5.4.5 Trasmissione dati anamnestici associati al ceppo batterico ("Scheda invio ceppi di *Listeria monocytogenes*")

Contestualmente all'invio del ceppo batterico, il responsabile del Laboratorio dovrà collegarsi al sistema informativo Sorveglianza Epidemiologica Agenti Patogeni alimentari (SEAP) all'indirizzo <a href="https://sorveglianza.izs.it/seap">https://sorveglianza.izs.it/seap</a> e compilare online la "Scheda invio ceppi di Listeria monocytogenes" secondo le istruzioni riportate nel manuale utente consultabile sullo stesso sito. E' necessario impiegare, come identificativo del ceppo, il numero univoco assegnato dal sistema SINSA al campione di origine al momento del prelievo e riportato sulla "Scheda accompagnamento campioni" (Allegato 1). Alla fine della compilazione della scheda sarà possibile stampare un'attestazione di conferma dell'avvenuto inserimento dei dati nel sistema, da allegare al ceppo inviato posizionandola tra il secondo e il terzo imballaggio di cui al paragrafo 5.4.4.

### 6. COMPOSIZIONE E MODALITÀ DI PREPARAZIONE DEI TERRENI

6.1. Terreno per trasporto ceppi batterici

### Composizione

Peptone	5 g
Estratto di carne	1 g
Estratto di Lievito	2 g
Cloruro di sodio	5 g
Agar	6 g
Acqua deionizzata	1000 ml
рН	$7.4 \pm 0.2$

### **Preparazione**

- Scogliere i componenti disidratati nelle quantità di acqua prevista riscaldando per ebollizione fino a completa solubilizzazione. Controllare e correggere il pH con Idrossido di Sodio 1N o Acido cloridrico 5N.
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1°C per 15 ± 1 minuto.
- Distribuire in provette di polistirene, o materiale equivalente, con tappo a doppia chiusura della capacità di 5 ml con 4 ml di terreno.

### **Conservazione**

Conservare a 5 ± 3°C per 4 mesi.

Laboratorio nazionale di riferimento per Listeria monocytogenes

IZS TE B3.1.9 SOP001

TITOLO: Procedura per l'invio dei ceppi di *Listeria*monocytogenes al Laboratorio nazionale di
riferimento

PAG. 8/9 REVISIONE N. 0

### 6.2. Agar sangue

### Composizione

Blood agar base	40 g
Acqua deionizzata	1000 ml
Sangue defibrinato	

Sangue defibrinato

di cavallo o montone 70 ml

- Blood agar base:

Proteose peptone 15, 0 g Digerito di fegato 2,5 g Estratto di lievito 5,0 g Cloruro di sodio 20,0 g Agar 12-18 g pH 7,0  $\pm$  0,2

### **Preparazione**

- Sciogliere i componenti disidratati del terreno base nella quantità di acqua prevista riscaldando per ebollizione fino a completa solubilizzazione.
- Controllare e, se necessario, correggere il pH con Idrossido di Sodio 1N o Acido cloridrico 5N.
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 15 ± 1 minuti.
- Raffreddare in bagnomaria il terreno base alla temperatura di  $45 \pm 0.5$ °C.
- Aggiungere 70 ml di sangue defibrinato di cavallo o montone per ogni 1000 ml di terreno base.
- Distribuire in piastre Petri da 90 mm.

### Conservazione

Conservare a 5 ± 3°C per 4 mesi.

NOTA: se il terreno disidratato completo è disponibile in commercio già pronto, per la preparazione attenersi alle indicazioni della ditta fornitrice.

### 6.3. Tryptic soy agar (TSA)

### Composizione

Tryptone	15,0 g
Soytone	5,0 g
Cloruro di sodio	5,0 g
Agar	20,0 g

Laboratorio nazionale di riferimento per Listeria monocytogenes

IZS TE B3.1.9 SOP001 TITOLO: Procedura per l'invio dei ceppi di *Listeria* monocytogenes al Laboratorio nazionale di riferimento PAG. 9/9 REVISIONE N. 0

Acqua deionizzata pH  $7.3 \pm 0.2$ 

1000 ml

### **Preparazione**

- Sciogliere i componenti disidratati nella quantità di acqua prevista riscaldando per ebollizione, fino a completa solubilizzazione.
- Controllare e, se necessario, correggere il pH con Idrossido di Sodio 1N o Acido cloridrico 5N
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 15 ± 1 minuti.
- Distribuire in piastre Petri 90 mm.

### Conservazione

Conservare a 5 ± 3°C per 4 mesi.

NOTA: se il terreno disidratato completo è disponibile in commercio già pronto, per la preparazione attenersi alle indicazioni della ditta fornitrice.