



**I Riunione ENTER-VET
Legnaro, 17 dicembre 2014**

**Aggiornamento relativo
a recenti e prossime modifiche
della norma ISO 6579**

Progressi nella revisione della ISO 6579

Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* -

- Parte 1: Metodo orrizontale per l'identificazione di Salmonella – iter di approvazione - valutazione
- Parte 2: Quantificazione attraverso MPN miniaturizzato (miniMSRV): pubblicato a Novembre 2012
- Parte 3: Linee Guida per la sierotipizzazione di Salmonella: pubblicato a Luglio 2014

Parte 1 – identificazione di Salmonella

Considerazioni generali

- **Inserimento dell'Annex D** della ISO 6579(2007) per i campioni di produzione primaria
- Inserimento protocollo per l'identificazione di **S. Typhi e S. Paratyphi**
 - utilizzo di brodo Cisteina Selenite (CS) in combinazione di RVS e MKTTn come pre-arricchimento selettivo
 - utilizzo di Bismuth Sulphite (BS) Agar, in combinazione di XLD, come terreni selettivi differenziali

Parte 1 – identificazione di Salmonella

Arricchimento non selettivo

- Nella composizione dell'APTS, il tipo di peptone da utilizzare diviene meno prescrittivo:
ISO 6579:2002 indica 'enzymatic digest of casein'
Draft ISO 6579-1 indica 'Peptone' e riporta come nota 'per esempio enzymatic digest of casein'
- Il range di temperatura del terreno di arricchimento non selettivo (APTS) diviene più ampio:
ISO 6579:2002 indica $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
Draft EN ISO 6579-1 indica di incubare tra 34 °C e 38 °C
- La Draft EN ISO 6579-1 contempla la possibilità di conservare i **brodi di pre-arricchimento non selettivo e selettivo a temperatura di refrigerazione fino ad un massimo di 72 ore**

Parte 1 – identificazione di Salmonella

Arricchimento selettivo

- Terreni di arricchimento selettivo

Primo terreno di arricchimento selettivo: è possibile scegliere tra RVS e MSRV indipendentemente dalla matrice esaminata

Secondo terreno di arricchimento selettivo: MKTTn

Per i campioni di produzione primaria: solo MSRV (come stabilito al momento dall'Annex D)

Tempo di incubazione del terreno di pre-arricchimento selettivo rimane invariato a 24 ore, fatta eccezione per latte in polvere e formaggio per cui l'incubazione sarà 2x 24 h

Per i campioni di produzione primaria l'attuale procedura rimarrà invariata (semina in MSRV; incubazione APTS 2x 24h se necessario)

Parte 1 – identificazione di Salmonella

Semina e conferma

- XLD rimane il terreno selettivo-differenziale obbligatorio
- Questa fase rimane meno prescrittiva e ci si limita a riportare che è finalizzata a ottenere colonie ben isolate con morfologia tipica
- Viene aggiunto un Annex per indirizzare la scelta del secondo terreno selettivo da utilizzare in questa fase
- La fase di purificazione del ceppo, attraverso passaggio in nutrient agar , diviene opzionale, come al momento accade solamente per i campioni di produzione primaria

Parte 1 – identificazione di Salmonella

Semina e conferma

- Due test di conferma biochimica diventano opzionali: β -Galactosidase test e indolo
- Un test di conferma biochimica viene eliminato : reazione di Voges-Proskauer
- Indicazioni relative alla sierotipizzazione vengono eliminate e i dettagliati sono riportati nella ISO 6579 parte 3. Nella parte 1 rimane solo la conferma sierologica
- Viene aggiornata la tabella relativa all'interpretazione dei test biochimici

Parte 1 – identificazione di Salmonella

Dati sulle performance e caratteristiche del metodo

- Vengono aggiunti i test da eseguire per verificare la qualità dei terreni (al momento sono riportati nella ISO 11133)
- Sono aggiunti dati relativi all'accuratezza del metodo
- Sono eliminati i dati relativi ad accordanza e concordanza (Annex C)
- Sono aggiunti dati relativi a LOD50 (livello di identificazione alla concentrazione per cui la probabilità di identificazione è pari al 50%) per campioni alimentari (calcolati utilizzando dati grezzi di uno studio di validazione condotto nel 2000 a cui hanno partecipato i lab. nazionali di riferimento)
- Sono aggiunti dati di performance relativi all'analisi di campioni alimentari pre-arricchiti con MSR/V
- Sono aggiunti dati di performance relativi all'analisi di campioni di produzione primaria pre-arricchiti con MSR/V (dati relativi a 3 studi EURL-*Salmonella* studies: 2008, 2012, 2013)

Parte 2 – quantificazione di Salmonella

Scopo e campo di applicazione

La quantificazione di Salmonella viene eseguita attraverso il metodo MPN, basato su un sistema miniaturizzato che impiega piastre di MSRV

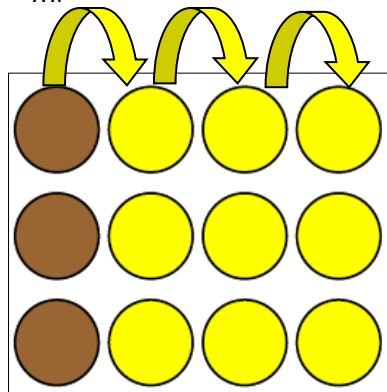
La procedura si applica alle seguenti matrici:

- alimenti per consumo animale e alimentare
- campioni ambientali nelle aree di produzione di alimenti
- campioni ambientali della produzione primaria
- feci animali

Dal momento che il volume delle diluizioni primarie testate è inferiore rispetto a quanto specificato nella ISO 6579 e Annex D, il limite di detection del metodo miniMSRV, (pari a 1 cfu/g), risulta inferiore rispetto a quello del metodo tradizionale di detection (0.04cfu/g)

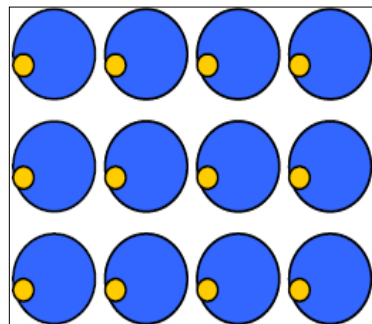
**Diluizioni seriali e
prearricchimento in
APTS**

500 μ l in 2
ml



Incubare a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
per 18 ± 2 h

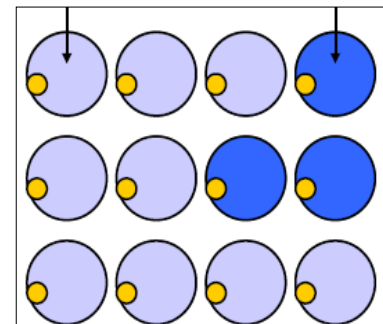
**Trasferimento di 20 μ l
di prearricchimento
su terreno MSR/V**



Incubare a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
per 24 ± 3 h. Pozzetti
negativi: reincubare fino
a 48 h.

**Arricchimento
selettivo su
MSRV**

Sciamura

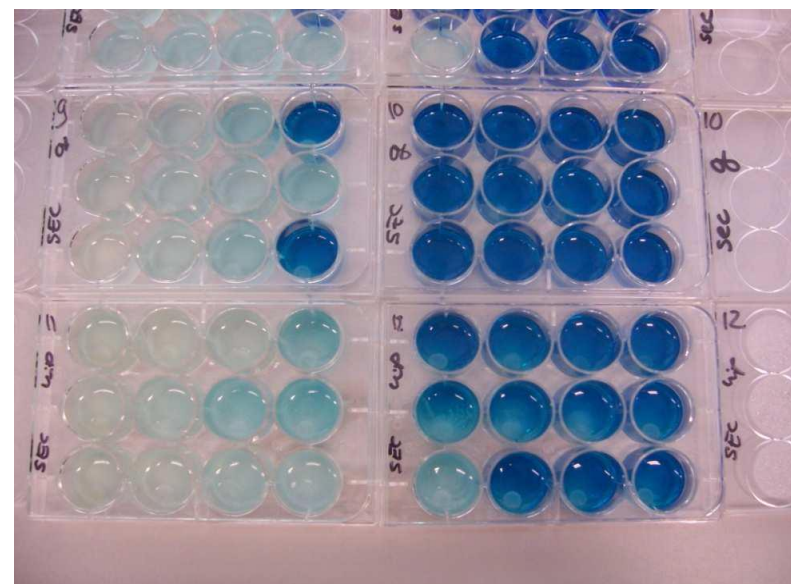
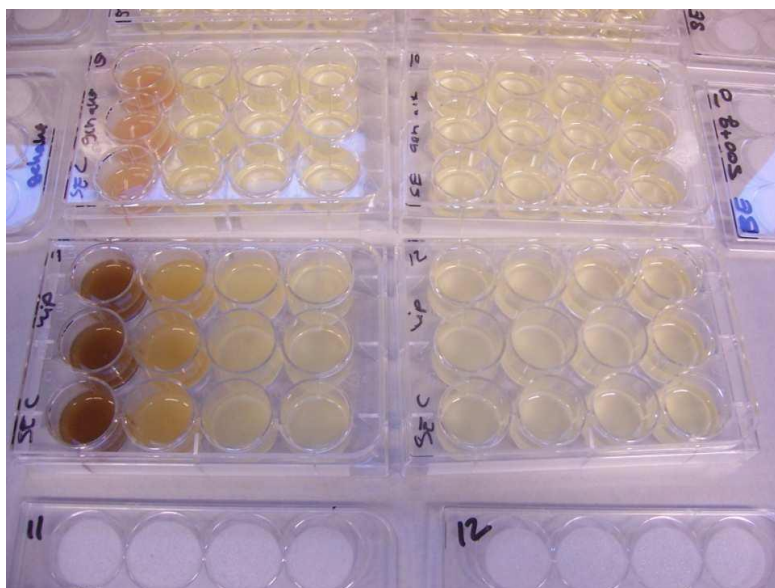


Seminare i pozzetti positivi su
un terreno di arricchimento
selettivo (XLD) e incubare a
 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 3 h.

Da ciascuna piastra XLD
prelevare una colonia
sospetta per sottoporla alle
prove biochimiche e alla
conferma definitiva.

Calcolo dell'MPN

Parte 2 – quantificazione di Salmonella



Parte 3 – Sierotipizzazione di Salmonella

Si tratta di un «Technical Report» – è una linea guida non una misura prescrittiva

Scopo: descrivere la procedura di sierotipizzazione di Salmonella
– è applicabile a tutti i ceppi puri che sono stati identificati come Salmonella attraverso prove di conferma biochimica, indipendentemente dalla fonte di isolamento

– si basa su quanto definito dallo schema White-Kauffmann-Le Minor

Parte 3 – Sierotipizzazione di Salmonella

Nomenclatura

Family: *Enterobacteriaceae* (first letter capitalized, italicized)

Genus: *Salmonella* (first letter capitalized, italicized)

species: *enterica* / *bongori* (not capitalized, italicized)

subspecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtanae*, *indica*
(not capitalized, italicized)

serovar: e.g. Typhimurium (first letter capitalized, not italicized)

Riporta lo schema delle prove biochimiche per differenziare specie e subspecies
(Grimont et al., 2007)

Parte 3 – Sierotipizzazione di Salmonella

Procedura

Dal momento che non è possibile dare delle regole specifiche per eseguire la sierotipizzazione di ogni singolo sierotipo di Salmonella, la norma riporta indicazioni molto generiche. Suggerisce di seguire le indicazioni riportate dal produttore degli antisieri utilizzati

Nel caso in cui sia necessario sierotipizzare un ceppo sconosciuto è necessario partire utilizzando pool di antisieri e poi in caso di risultato positivo procedere con antisieri «fattore specifico». Nel caso in cui sia sufficiente identificare alcuni specifici sierotipi è possibile lavorare solo con gli antisieri «fattore specifico».

Ribadisce di partire da una coltura pura, seminata nel terreno di coltura indicato dal produttore dei sieri impiegati, o se non specificato nutrient agar. La coltura da utilizzare deve essere incubata overnight a temperatura tra 34 e 38 °C

Parte 3 – Sierotipizzazione di Salmonella

Procedura

Test con soluzione fisiologica per verificare che non sia un ceppo autoagglutinante – nel caso di ceppi autoagglutinanti suggeriscono ad esempio di fare un passaggio del ceppo in un terreno semisolido

- Descrizione molto generica della procedura da seguire per verificare agglutinazione antigeni somatici – ciliari e inversione di fase
- Descrive nel dettaglio tutti i passaggi da eseguire per l'identificazione di isolati di *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Virchow*, *S. Infantis* e *S. Hadar*

Parte 3 – Sierotipizzazione di Salmonella

Controlli di qualità

- Verificare che l'antisiero che si sta utilizzando non sia torbido, nel caso di torbidità è necessario seguire le indicazioni del produttore

Vengono elencati differenti approcci per garantire la qualità dei dati ottenuti

- **Settimanalmente devono essere selezionati 2 isolati** (oppure un numero di isolati che sia pari a circa il 2% degli isolati sierotipizzati settimanalmente). Da ciascun ceppo devono essere allestite due colture e il duplicato di ciascun ceppo deve essere trattato come un nuovo campione da sierotipizzare al fine di evidenziare eventuali differenze.
- Il laboratorio deve tenere **una collezione di ceppi «di riferimento»** (p.e. ceppi esaminati nell'ambito di RT) e con cadenza regolare (p.e. settimanalmente) viene sierotipizzato uno dei ceppi della collezione
- Partecipazione regolare a **circuiti interlaboratorio**

Parte 3 – Sierotipizzazione di Salmonella

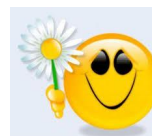
Espressione dei risultati

- Per isolati di *S. enterica* subsp. *enterica* bisogna riportare il nome del sierotipo e possibilmente la formula antigenica. Per gli isolati di altre sottospecie riportare la formula antigenica.
- La formula antigenica deve essere riportata secondo le indicazioni del manuale White-Kauffmann
- **E' necessario riportare quanto è stato effettivamente identificato, non la formula teorica**

1,4,[5],12:i:1,2



4,12:i:1,2



Parte 3 – Sierotipizzazione di Salmonella

Espressione dei risultati

Per le specie differenti rispetto a *S. enterica* devono essere utilizzati i seguenti simboli:

- II per *S. enterica* subsp. *salamae*
- IIIa per *S. enterica* subsp. *arizonae*
- IIIb per *S. enterica* subsp. *diarizonae*
- IV per *S. enterica* subsp. *houtenae*
- VI per *S. enterica* subsp. *indica*

Per es. S. II 3:z10:e,n,x,z15



Parte 3 – Sierotipizzazione di Salmonella

Lista Annex

- A - terreni di coltura e reagenti, composizione e modalità di preparazione
- B - Schematizza gli step da seguire per la sierotipizzazione di un ceppo sconosciuto di Salmonella
- C - test biochimici – elenca alcuni dei test che devono essere eseguiti per differenziare le subspecie e per la differenziazione tra *S. Paratyphi B* e *S. Paratyphi B* variante Java
- D - Schematizza gli step da seguire per la sierotipizzazione di un ceppo appartenente ai 5 sierotipi rilevanti
- E – Protocollo dettagliato per eseguire micrometodo (agglutinazione lenta in piastra)
- F – Descrizione delle metodiche per l'inversione di fase

E' finita qua???????

- C'è un ulteriore gruppo di lavoro ISO che sta lavorando alla definizione di un protocollo per l'identificazione molecolare della variante monofasica di *S. Typhimurium*

