



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Piano Nazionale di Controllo delle Salmonellosi negli avicoli 2022/2024 gestione dei campioni, delle analisi e degli esiti presso l'IZSLT

La sierotipizzazione e la caratterizzazione degli isolati di *Salmonella* spp.: focus sull'esecuzione della prova (ISO 6579-3, POS MIC 050 NOR) e metodiche alternative

Gina Di Giampietro/Maria Laura De Marchis

Centro di riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni (C.R.E.P.)

08 novembre 2022



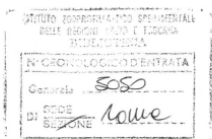


Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

ISO/TR 6579-3

TECHNICAL REPORT

ISO/TR 6579-3



First edition
2014-07-15

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

Part 3:
**Guidelines for serotyping of
Salmonella spp.**

*Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour
la recherche, le dénombrement et la sérotypie des Salmonella —
Partie 3: Lignes directrices pour la sérotypie des Salmonella spp.*

- La ISO 6579-3 è una linea guida per la sierotipizzazione di *Salmonella* spp basata sullo schema KAUFFMANN WHITE – LE MINOR
- Si tratta di un «Technical Report» – è una linea guida non una misura prescrittiva
- E' applicabile a tutti i ceppi puri che sono stati identificati come *Salmonella* spp attraverso prove di conferma biochimica, indipendentemente dalla fonte di isolamento
- Suggerisce di seguire le indicazioni riportate dal produttore degli antisieri utilizzati
- Prevede l'esecuzione di un test con soluzione fisiologica per verificare che non sia un ceppo autoagglutinante
- 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*



Attualmente vengono utilizzati contemporaneamente:

- Lo schema Kauffmann-White per quanto riguarda l'elenco dei sierotipi
- La nomenclatura di Le Minor per quanto riguarda la suddivisione in sottospecie

Genere *Salmonella*

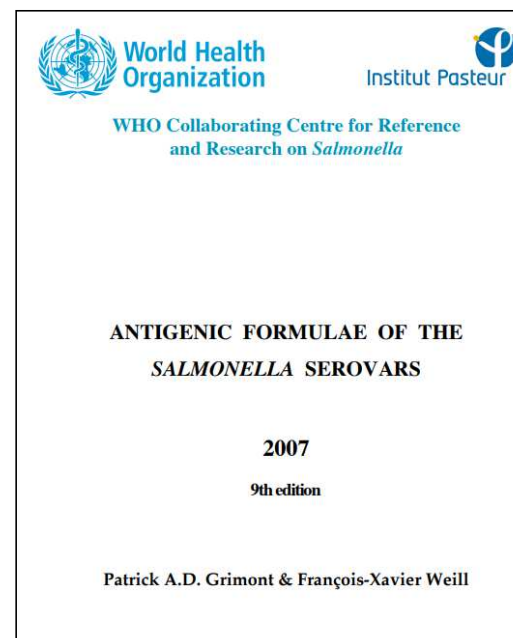
(Nomenclatura “Le Minor, 1987”)

Specie enterica

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

Specie bongori

Schema Kauffmann-White



Present number of serovars in each species and subspecies

<i>S. enterica</i>	2 557
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1 531
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	505
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	99
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	336
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houstenae</i>	73
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>	22
Total (genus <i>Salmonella</i>)	2 579





8 Taxonomy of *Salmonella*

8.1 General

Approximately every 7 years, the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* (Institut Pasteur, Paris) publishes an update of the "Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars", which is the basis for assigning serovar names and formulas to isolates of *Salmonella* spp. At the time of publication, the latest version of the White-Kauffmann-Le Minor scheme is that of 2007 (Reference [9]).

NOTE Supplements to the White-Kauffmann-Le Minor scheme are published in *Research in Microbiology*, a publication of the Institut Pasteur (formerly called *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*). For instance, supplement no. 47 was published in 2010 and characterises new serovars found between 2003 and 2007 (Reference [10]).

Supplementi periodici (OMS e Istituto Pasteur)

ELSEVIER CrossMark Institut Pasteur
Research in Microbiology 165 (2014) 526–530 www.elsevier.com/locate/resmic

Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme[☆]

Sylvie Issenuth-Jeanjean^a, Peter Roggentin^b, Matthew Mikoleit^c, Martine Guibourdenche^a,
Elizabeth de Pinna^d, Satheesh Nair^d, Patricia I. Fields^c, François-Xavier Weill^{a,*}

^a Institut Pasteur, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Unité des Bactéries Pathogènes Entériques, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris cedex 15, France
^b Salmonella-Zentrale, Institut für Hygiene und Umwelt, Hamburg, Germany
^c Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA
^d Public Health England, Gastrointestinal Bacteria Reference Unit, Colindale, UK

Received 4 July 2014; accepted 6 July 2014
Available online 15 July 2014





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

POS MIC 050 NOR

MOD 016 rev 1 del 03/05/2019



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

UNITÀ OPERATIVA COMPLESSA MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI

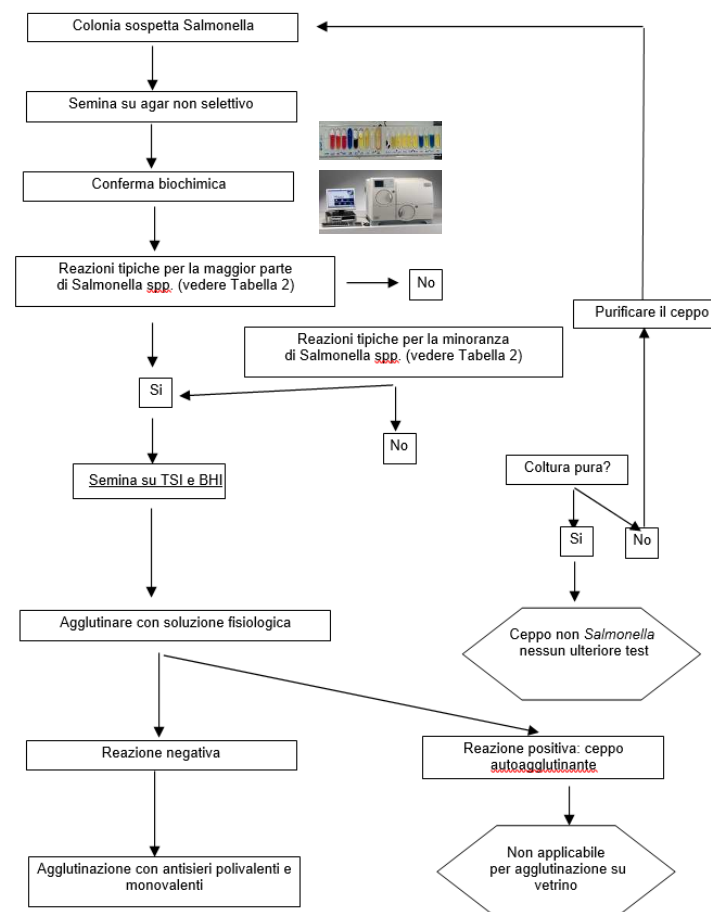
POS MIC 050 NOR rev. 5

SIEROTIPIZZAZIONE DI SALMONELLA SPP (SIEROAGGLUTINAZIONE)

pag. 1 di 9

SIEROTIPIZZAZIONE DI SALMONELLA SPP (SIEROAGGLUTINAZIONE)

Rev.	Data di emissione:	Redazione Incaricato Struttura	Verifica Responsabile della prova/Responsabile taratura/attività	Convalida Qualità	Approvazione Responsabile di Struttura
5	26/04/2022	Maria Laura De Marchis	Teresa Bossù	Sara Greco	Stefano Bilei
4	12/11/2020	Maria Laura De Marchis	Teresa Bossù	Sara Greco	Stefano Bilei
3	28/11/2019	Maria Laura De Marchis	Teresa Bossù	Sara Greco	Stefano Bilei



Sierotipizzazione di *Salmonella* spp

Agglutinazione diretta su vetrino tra Antigeni somatici e flagellari con Antisieri specifici

(Kauffmann-White – Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars 2007 9th edition)

- Antigene capsulare	➡	Vi (virulenza)	} SIEROTIPO
- Antigene somatico O	➡	Gruppo di appartenenza	
- Antigene flagellare H	➡	I,II,III fase flagellare	



Sieroagglutinazione rapida *Salmonella* spp

Onnivalente (insieme di tutti i polivalenti)

Esempio:

- Poli A-67-Vi (unico)
- Poli A-S-Vi+Poli 42-67

Antigene VI (CAPSULARE)

Polivalente H

Ag somatico O (Gruppo)

Fattore numerico che
determina il gruppo

Es: O:4 (B) oppure O:61

Ag flagellare H I,II,III fase
(gruppo di sierotipi)

L'unica *Salmonella* priva
di fasi flagellari è la *S.*
Gallinarum

1,9,12:-:- O9(D1)

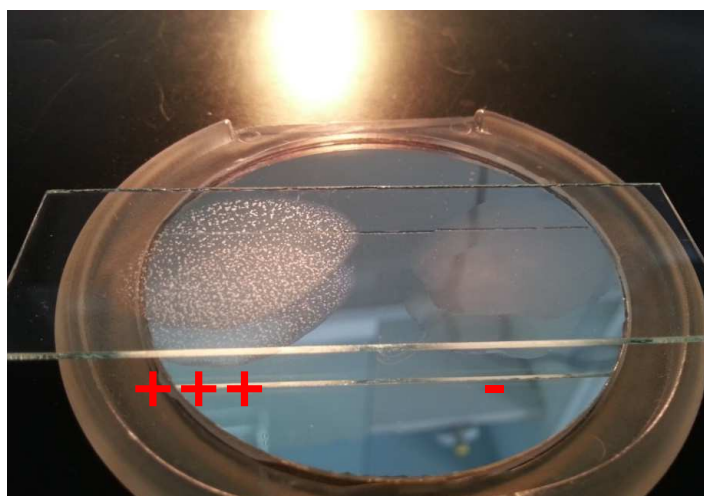
Sierotipo



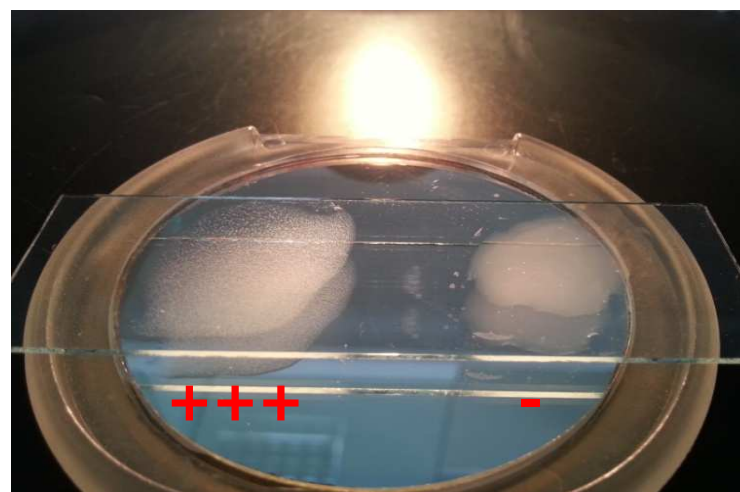
Sieroagglutinazione rapida

Stemperare su un vetrino porta oggetto un'ansata della coltura in esame (non auto-agglutinante) ottenuta da NA, TSA o da TSI dopo incubazione per 18-24 ore a 34-38°C, in una goccia di siero specifico.

Oscillare delicatamente il vetrino per 5-30 secondi. In presenza di agglutinazione, la reazione è da considerarsi positiva.



Antigene somatico



Antigene flagellare



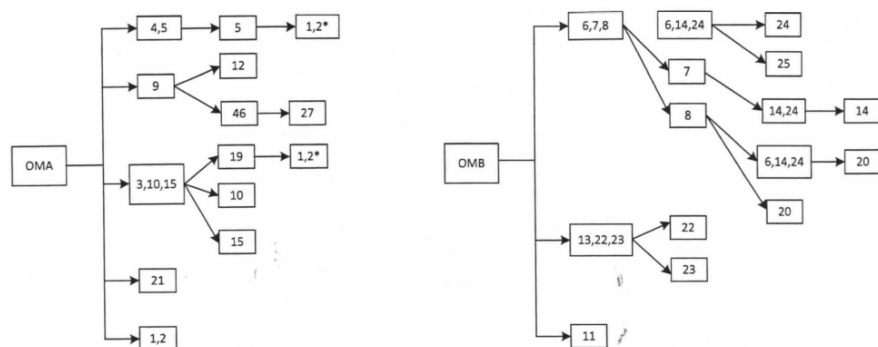
Esaltazione/Inversione di fase

La tecnica dell'inversione di fase prevede le seguenti operazioni:

- versare il terreno **SGM** precedentemente sciolto in **bagnomaria a 98°C** in piastra petri sterile
 - attendere che solidifichi quindi porre al centro della piastra **2 - 3 gocce di siero flagellare** corrispondente alla fase già tipizzata, quindi da bloccare
 - seminare un'ansata di **coltura (pura)** proveniente da **TSI, NA**, o da **TSA**
 - incubare in **termostato a 34-38°C per 18-24 ore**
 - saggiare la coltura con i sieri per determinare l'altra fase flagellare se presente
- NOTA:** nel caso si riscontri un ceppo appartenente al Gruppo somatico **9,12 (D1)** sul quale non si evidenzia alcun antigene flagellare, è necessario determinarne la mobilità per l'eventuale conferma di ***Salmonella Gallinarum* (sierotipo immobile)**



Sieroagglutinazione rapida

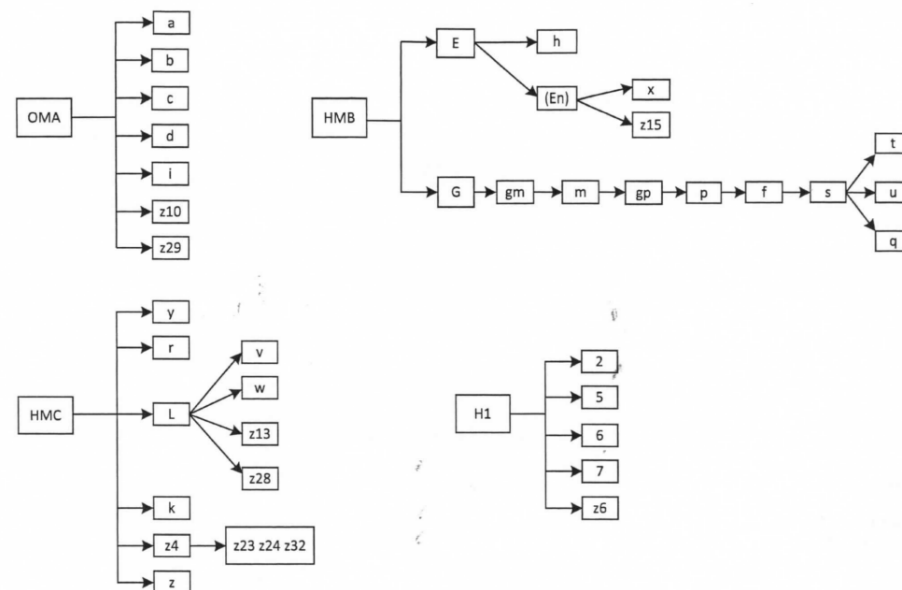


OMC	→	16	→	17	→	18	→	28	→	30	→	35	→	38
OMD	→	39	→	40	→	41	→	42	→	43	→	44	→	45
OME	→	47	→	48	→	50	→	51	→	52	→	53	→	61
OMF	→	54	→	55	→	56	→	57	→	58	→	59		
OMG	→	60	→	62	→	63	→	65	→	66	→	67		

* O:1,2 serum can be used to test for the presence of the O:1 antigen

a) Somatic antigens — Possible sequential tests on polyvalent and monovalent antisera to detect somatic *Salmonella* antigens (derived from Reference [6]) [The next step in the horizontal line is taken when the previous test shows a positive reaction (e.g. if O:4,5 is positive, then test for O:5, etc.). The composition of the polyvalent antisera as used in this scheme is given in Table B.2.]

Test sequenziali per antigeni somatici



b) Flagellar antigens — Possible sequential tests on polyvalent and monovalent antisera to detect flagellar *Salmonella* antigens (derived from Reference [6]) [The next step in the horizontal line is taken when the previous test shows a positive reaction. The composition of the polyvalent antisera as used in this scheme is given in Table B.2.]

Test sequenziali per antigeni flagellari



Sieroagglutinazione rapida

Group O:4 (B)

Presentation of factor O:27 was modified. See page 8.

Type	Somatic (O) antigen	Flagellar (H) antigen		
		Phase 1	Phase 2	Other
Kisangani	1,4,[5],12	a	1,2	
Hessarek ¹	4,12,[27]	a	1,5	
Fulica ¹	4,[5],12	a	[1,5]	
Arechavaleta	4,[5],12	a	1,7	
Bispebjerg	1,4,[5],12	a	e,n,x	
Tinda	1,4,12,27	a	e,n,z ₁₅	
II	1,4,[5],12,[27]	a	e,n,x	
Huettwilen	1,4,12	a	1,w	
Nakuru	1,4,12,27	a	z ₆	
II	1,4,12,[27]	a	z ₃₀	
Paratyphi B ²	1,4,[5],12	b	1,2	[z ₅], [z ₁₀]
Limete	1,4,12,[27]	b	1,5	
II	4,12	b	1,5	
Canada	4,12,[27]	b	1,6	
Uppsala	1,4,12,27	b	1,7	
Abony	1,4,[5],12,[27]	b	e,n,x	
II	1,4,[5],12,[27]	b	[e,n,x]	
Wagenia	1,4,12,27	b	e,n,z ₁₅	
Wien	1,4,12,[27]	b	1,w	
Tripoli	1,4,12,27	b	z ₆	
Schleissheim ¹	4,12,27	b	-	
Legon	1,4,12,[27]	c	1,5	
Abortusovis	4,12	c	1,6	
Altendorf	4,12,[27]	c	1,7	
Bissau	4,12	c	e,n,x	
Jericho	1,4,12,27	c	e,n,z ₁₅	
Hallford	1,4,12,27	c	1,w	
Bury	4,12,27	c	z ₆	
Stanley	1,4,[5],12,[27]	d	1,2	
Eppendorf	1,4,12,[27]	d	1,5	
Brezany	1,4,12,27	d	1,6	

18/166

Group O:4 (B)

Presentation of factor O:27 was modified. See page 8.

Type	Somatic (O) antigen	Flagellar (H) antigen		
		Phase 1	Phase 2	Other
Kisangani	1,4,[5],12	a	1,2	
Hessarek ¹	4,12,[27]	a	1,5	
Fulica ¹	4,[5],12	a	[1,5]	
Arechavaleta	4,[5],12	a	1,7	
Bispebjerg	1,4,[5],12	a	e,n,x	
Tinda	1,4,12,27	a	e,n,z ₁₅	
II	1,4,[5],12,[27]	a	e,n,x	
Huettwilen	1,4,12	a	1,w	
Nakuru	1,4,12,27	a	z ₆	
II	1,4,12,[27]	a	z ₃₀	
Paratyphi B ²	1,4,[5],12	b	1,2	[z ₅], [z ₁₀]
Limete	1,4,12,[27]	b	1,5	
II	4,12	b	1,5	
Canada	4,12,[27]	b	1,6	
Uppsala	1,4,12,27	b	1,7	
Abony	1,4,[5],12,[27]	b	e,n,x	
II	1,4,[5],12,[27]	b	[e,n,x]	
Wagenia	1,4,12,27	b	e,n,z ₁₅	
Wien	1,4,12,[27]	b	1,w	
Tripoli	1,4,12,27	b	z ₆	
Schleissheim ¹	4,12,27	b	-	
Legon	1,4,12,[27]	c	1,5	
Abortusovis	4,12	c	1,6	
Altendorf	4,12,[27]	c	1,7	
Bissau	4,12	c	e,n,x	
Jericho	1,4,12,27	c	e,n,z ₁₅	
Hallford	1,4,12,27	c	1,w	
Bury	4,12,27	c	z ₆	
Stanley	1,4,[5],12,[27]	d	1,2	
Eppendorf	1,4,12,[27]	d	1,5	
Brezany	1,4,12,27	d	1,6	

18/166

Typhimurium	1,4,[5],12	i	1,2
Lagos	1,4,[5],12	i	1,5
Agama	4,12	i	1,6
Farsta	4,12	i	e,n,x
Tsevie	1,4,12	i	e,n,z ₁₅
Gloucester	1,4,12,27	i	1,w
Tumodi	1,4,12	i	z ₆
II	4,12,27	i	z ₃₅

Scelta dell'antigene da testare guidata da:

- Tipo di matrice
- Storico (ricorrenza di determinati sierotipi)

➡ Esperienza dell'operatore



Prove biochimiche

Differential characters of *Salmonella* species and subspecies

Species	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
Subspecies	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Characters							
Dulcitol	+	+	–	–	–	d	+
ONPG (2 h)	–	–	+	+	–	d	+
Malonate	–	+	+	+	–	–	–
Gelatinase	–	+	+	+	+	+	–
Sorbitol	+	+	+	+	+	–	+
Growth with KCN	–	–	–	–	+	–	+
L(+)-tartrate ^(a)	+	–	–	–	–	–	–
Galacturonate	–	+	–	+	+	+	+
γ-glutamyltransferase	+(*)	+	–	+	+	+	+
β-glucuronidase	d	d	–	+	–	d	–
Mucate	+	+	+	– (70%)	–	+	+
Salicine	–	–	–	–	+	–	–
Lactose	–	–	– (75%)	– (75%)	–	d	–
Lysed by phage O1	+	+	–	+	–	+	d
Usual habitat	Warm-blooded animals			Cold-blooded animals and environment			

(a) = *d*-tartrate.

(*) = Typhimurium d, Dublin –.

– = 90 % or more positive reactions.

– = 90 % or more negative reactions.

d = different reactions given by different serovars.

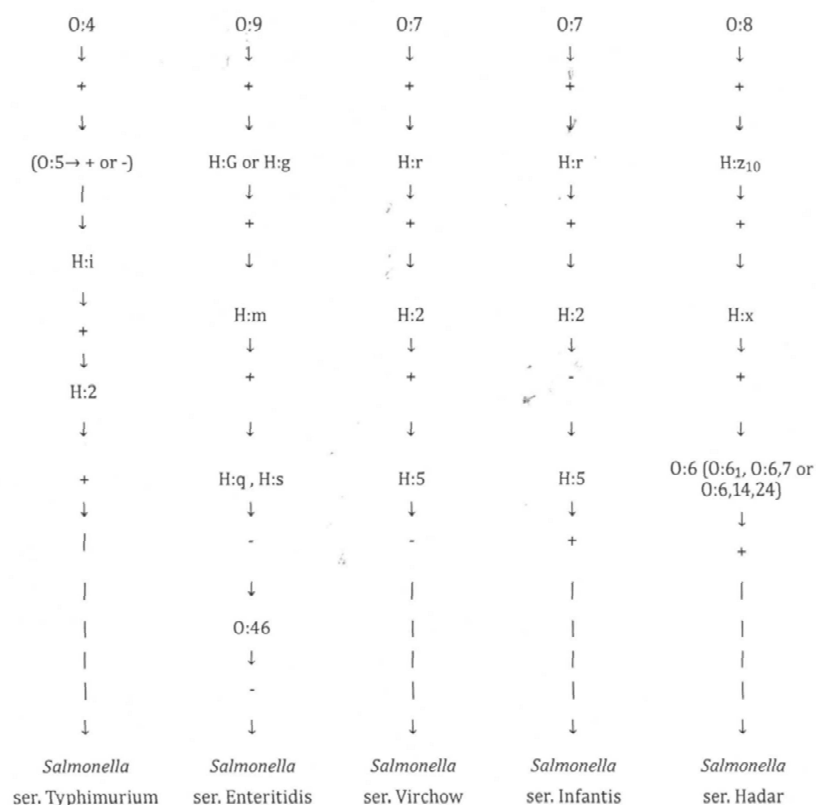
Esempio:

Kiambu	<u>1,4,12</u>	Z	1,5
II	<u>1,4,12,27</u>	Z	1,5
Loubomo	<u>4,12</u>	Z	1,6
Indiana	<u>1,4,12</u>	Z	1,7
II	<u>4,12</u>	Z	1,7
Neftenbach	<u>4,12</u>	Z	e,n,x
II	<u>1,4,12,27</u>	Z	e,n,x
Koenigstuhl	<u>1,4,[5],12</u>	Z	e,n,Z ₁₅
Preston	<u>1,4,12</u>	Z	1,w
Entebbe	<u>1,4,12,27</u>	Z	Z ₁₅



Sierotipi rilevanti per la salute pubblica

Schematic overview for serotyping five important public-health related *Salmonella* serovars



Sierotipi di <i>Salmonella</i> rilevanti per la salute pubblica	Per i gruppi di riproduttori <i>Gallus gallus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <i>Salmonella</i> Enteritidis, <i>Salmonella</i> Typhimurium, compresa la variante monofasica con formula antigenica 1,4[5],12:i:- <i>Salmonella</i> Infantis <i>Salmonella</i> Virchow, <i>Salmonella</i> Hadar
	Per i gruppi di ovaiole, polli da carne, tacchini da riproduzione e ingrasso	<ul style="list-style-type: none"> <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>Salmonella</i> Typhimurium, compresa la variante monofasica con formula antigenica 1,4[5],12:i:-

SIEROTIPO

S. Typhimurium

***S. Typhimurium* monofasica**

S. Infantis

S. Enteritidis

S. Virchow

S. Hadar

FORMULA ANTIGENICA

1,4,[5],12:i:1,2 O:4 (B)

1,4,[5],12:i:- O:4 (B)

6,7,14:r:1,5 O:7 (C1)

9,12:g,m:- O:9 (D1)

6,7,14:r:1,2 O:7 (C1)

6,8;z10:e,n,x O:8 (C2-C3)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Partecipazione a circuiti e studi interlaboratorio



Circuito interlaboratorio di Sierotipizzazione di *Salmonella* Spp.
Report definitivo schema AQUA SA1/SA2-22
Anno di erogazione 2022



Centro di riferimento nazionale per le salmonellosi
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie



2.1 COMPOSIZIONE DEI CAMPIONI PROVA

Ai singoli partecipanti sono stati inviati 20 ceppi da sottoporre a sierotipizzazione per lo schema SA1 e 10 ceppi per lo schema SA2.

Nella tabella 1 sono riportate le formule antigeniche e il sierotipo dei ceppi inviati ai partecipanti dello schema SA1.

N. Campione	Risultato Atteso		
	Antigene Somatico	Antigeni ciliari	Sierotipo
S1	13,23	i.e.h.12	S. Jukestown
S2	1,4,[5],12	i.1,2	S. Typhimurium
S3	6,8	z10:e,h,x	S. Hadar
S4	1,4,12,27	z20:-	S. Brancaster
S5	8	d.1,2	S. Virginia
S6	1,13,23	g,m,[s],[t]-	S. Agbeni
S7	1,9,12	g,m:-	S. Enteritidis
S8	1,4,[5],12	i:-	VMST
S9	6,7,14	i.1,2	S. Augustenborg
S10	1,4,12,[27]	l,[z9]z20:1,5	S. Tyresoe
S11	11	l,v.1,2	S. Stendal
S12	6,8	e,h.1,5	S. Kottbus
S13	1,9,12	a,e,h.12	S. Durban
S14	6,7	e,h.1,2	S. Larochelle
S15	6,7,14	r.1,2	S. Virchow
S16	6,7,14	y.1,5	S. Bareilly
S17	3,10	b,e,n,x	S. Benfica
S18	6,7,14	r.1,5	S. Infantis
S19	4,12,[27]	b.1,6	S. Canada
S20	3,[10],[15]	r.2e	S. Weltevreden

Tab. 1 - Formule antigeniche dei ceppi di *Salmonella* spp. utilizzati (schema di Kauffmann-White-Le Minor, 2007 e successive modifiche ed integrazioni)



Studio interlaboratorio
di identificazione della specie/sottospecie
di appartenenza
sulla base del profilo biochimico

OBIETTIVO

Lo scopo del presente studio è quello di valutare la capacità dei laboratori partecipanti di identificare la specie/sottospecie di appartenenza dei ceppi in esame sulla base del loro profilo biochimico

DETTAGLI

Il genere *Salmonella* consiste di due sole specie, *S. enterica* e *S. bongori*. *S. enterica* si divide in sei sottospecie (*S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica*).

I ceppi sono seminati per infusione in terreno di mantenimento (Agar Triptossio) e sono stati sottoposti alle seguenti prove biochimiche in macrometodo:

Dulcitol
Incubazione a 37° C ± 1° C e lettura dopo 24h ± 3 e dopo 48h ± 3. La comparsa del viraggio da viola a giallo è indice della fermentazione del dulcitol. Se non si verifica nessun viraggio la reazione è negativa.

ONPG
Incubazione a 37° C ± 1° C e lettura dopo 24h ± 3 e dopo 48h ± 3. La comparsa di una colorazione giallo intenso del terreno è indice della presenza dell'enzima β-galattosidasi (reazione positiva). Se il terreno rimane incolore la reazione è negativa.

Malonato
Incubazione a 37° C ± 1° C e lettura dopo 24h ± 3 e dopo 48h ± 3. La comparsa del viraggio da verde a blu di prussia è indice della fermentazione del malonato. Se non si verifica nessun viraggio la reazione è negativa.

Sorbitolo
Incubazione a 37° C ± 1° C e lettura dopo 24h ± 3 e dopo 48h ± 3. La comparsa del viraggio da viola a giallo è indice della fermentazione del sorbitolo. Se non si verifica nessun viraggio la reazione è negativa.

Salicina
Incubazione a 37° C ± 1° C e lettura dopo 24h ± 3 e dopo 48h ± 3. La comparsa del viraggio da viola a giallo è indice della fermentazione della salicina. Se non si verifica nessun viraggio la reazione è negativa.

CRN Salmonellosi
Responsabile dott.ssa Lisa Barco
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
V.le dell'Università 10-35020 LEGNARO (PD) www.izsvenezia.it



Specie	S. enterica						S. bongori
	enterica	salamae	arizonae	diarizonae	houtenae	indica	
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG	-	-	+	+	-	d	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Sorbitolo	+	+	+	+	+	-	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lattosio	-	-	-(75%)	+(75%)	-	d	-

Tab. 1

- Circuito interlaboratorio di Sierotipizzazione di *Salmonella* Spp.
- Schema Circuito AQUA SA1 (20 ceppi)
- Frequenza annuale



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Centro di riferimento Regionale per gli Enterobatteri Patogeni (C.R.E.P.)

STEFANO BILEI

TERESA BOSSU'

MARIA LAURA DE MARCHIS

GINA DI GIAMPIETRO

MARIA GRAZIA MARROCCO

EMILIA RASILE

SILVIA VITA



GRAZIE PER L'ATTENZIONE!





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Metodiche di supporto (laboratorio LTV)

Determinazione molecolare della prima fase flagellare di *Salmonella* spp.

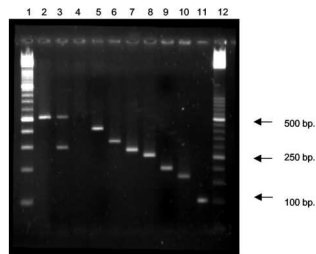


FIG. 1. Multiplex PCR amplification of *Salmonella* first-phase flagellar antigens. Lane 1, 100-bp ladder (Amersham Biosciences); lane 2, serotype Derby (H₁g); lane 3, serotype Enteritidis (H₁g,m); lane 4, serotype Mikawasma (H₁y); lane 5, serotype Hadar (H₁z,q); lane 6, serotype Brandenburg (H₁v); lane 7, serotype Infantis (H₁r); lane 8, serotype Typhimurium (H₁i); lane 9, serotype Anatum (H₁z,h); lane 10, serotype Ohio (H₁b); lane 11, serotype Grumpensis (H₁d); lane 12, 50-bp ladder (Amersham Biosciences).

- Tale metodica si basa sulla differenziazione di regioni interne del gene *fliC* che codificano per gli antigeni flagellari H:i, H:r, H:l,v, H:e,h, H:z10, H:b, H:d di *Salmonella* spp e del complesso antigenico flagellare G (g,m, g,m,s, g,m,t, g,p, g,p,s, g,m,q, g,q, g,m,p, g,m,p,s, g,m,s,t, g,s,t, m,t, m,p,t,u, f,g,s, f,g,m,t, g,z51, e g,z63)
- Comprende una coppia di primer specifica per identificare il complesso g,m del sierotipo Enteritidis

Determinazione molecolare della seconda fase flagellare di *Salmonella* spp.

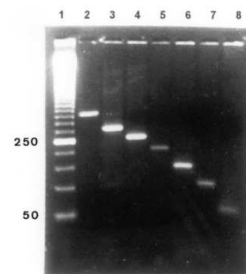


Fig. 2. Multiplex PCR amplification of *Salmonella* second-phase flagellar antigens. Lane 1, 50-bp ladder (Amersham Pharmacia Biotech Inc.); Lane 2, serotype Typhimurium (H₁2); Lane 3, serotype Anatum (H₁6); Lane 4, serotype Ohio (H₁w); Lane 5, serotype Grumpensis (H₁7); Lane 6, serotype Brandenburg (H₁z,q); Lane 7, serotype Infantis (H₁5); Lane 8, serotype Hadar (H₁e,x).

- Tale metodica si basa sulla differenziazione di regioni interne del gene *fliB* che codificano per gli antigeni flagellari H:l,w, H:e,n,x e H:e,n,z15 di *Salmonella* spp e delle regioni interne del complesso antigenico flagellare H:1 (H:1,2, H:1,5, H:1,6 e H:1,7) (POS MIC 008 INT).

Determinazione molecolare del sierogruppo di *Salmonella* spp.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Metodiche di supporto (IZSVe)

ISO/CD TS 6579-4 **Under development**

Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 4: Identification of monophasic *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) by polymerase chain reaction (PCR)

E' importante verificare che un ceppo che mostra formula antigenica 1,4,[5],12:i:- sia davvero una variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:1,2) piuttosto che una variante monofasica di altri sierotipi non-target come *S. Lagos* (1,4,[5],12:i:1,5), *S. Agama* (4,12:i:1,6), *S. Farsta* (4,12:i:e,n,x), *S. Tsevie* (1,4,12:i:e,n,z15), *S. Gloucester* (1,4,12,27:i:l,w), o *S. Tumodi* (1,4,12:i:z6). La differenziazione tra questo sierotipo target e quelli non target può essere ottenuta solo attraverso un metodo molecolare (e.g. PCR)

3 PCR protocols:

1. Multiplex real-time PCR assay; Primers and probes published by Maurischat et al. 2015, Int. Food Microbiol. 193:8-14.
2. Agarose gel-based multiplex PCR assay; Primers published by Tennant et al. 2010 PLoS Negl. Trop. Dis. Mar 9;4(3):e621'; and EFSA 2010, EFSA Journal, 8(10), p. 1826.
3. Agarose gel-based single target PCR assay; Primers published by Maurischat et al. 2015, Int. Food Microbiol. 193:8-14.

Aggiornamenti dal Centro di Referenza

7 ottobre 2021 VII Incontro Annuale
laboratori rete Enter vet



PDP BAT 192

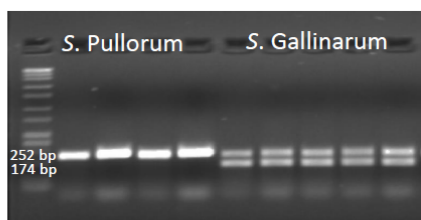
Subtipizzazione molecolare di
Salmonella enterica sierotipo
Typhimurium e sua variante
monofasica (*S.* 4,[5],12:i:-) mediante
Multiple Locus Variable number
tandem repeat Analysis (MLVA)

- PCR Multiplex + Sequenziamento Sanger
- Analisi di 5 regioni VNTR (STTR9, STTR6, STTR5, STTR10 e STTR3)
- Analisi rapida, utile per gli studi di outbreak

Dicembre 2021

PDP BAT 206

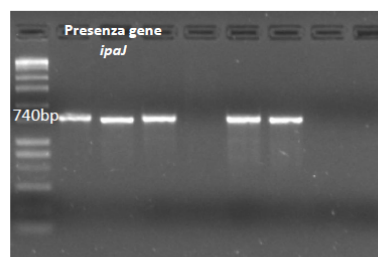
Identificazione di *Salmonella enterica*
subsp. *enterica* sierotipo *gallinarum*,
biovariante *gallinarum* e biovariante
pullorum mediante multiplex PCR



- Gene *glgC*: coinvolto nella biosintesi glicogeno, amplificato di 174 bp, specifico della biovariante *gallinarum*
- Gene *speC*: coinvolto nella decarbossilazione ornitina, amplificato di 252 bp, presente in entrambe le biovarianti

Dicembre 2021

Procedura di Prova
RILEVAZIONE DEL GENE *IPAJ* IN SALMONELLA
ENTERICA SIEROTIPO GALLINARUM BIOVARIANTE
PULLORUM TRAMITE PCR



- Gene *ipaJ* localizzato nel plasmide pSPUS1
- Gene immunogeno, coinvolto nell'invasione macrofagica, amplificato di 740 bp
- Ruolo determinante durante l'infezione da *S. gallinarum* biovar *pullorum*

7.4 Metodi di analisi in ambito PNCS

Metodi di analisi per l'isolamento e la sierotipizzazione

In accordo a Reg. (UE) 2019/268, per l'analisi di isolamento e sierotipizzazione possono essere utilizzati, sia nell'ambito dell'autocontrollo aziendale che nell'ambito dei controlli ufficiali, oltre che i metodi ufficiali di riferimento anche metodi alternativi, purché validati in conformità all' EN ISO 16140-2 (per isolamento) e a EN ISO 16140-6 (per sierotipizzazione) e accreditati dall'ente nazionale di accreditamento.

Metodi di analisi per l'isolamento

I metodi di riferimento sono i seguenti:

- Metodica di analisi per la rilevazione di *Salmonella* spp. di cui alla EN/ISO 6579-1:2017/Amd.1:2020 accreditata dall'organismo nazionale di accreditamento
- Metodo alternativo purché validato in accordo alla norma EN/ISO 16140-2 e accreditato dall'organismo nazionale di accreditamento

I metodi di cui sopra si intendono da applicare ai campioni della produzione primaria, ovvero a **tutte le matrici** previste nell'ambito del presente piano, siano esse prelevate in autocontrollo o in regime di controllo ufficiale. I metodi alternativi utilizzabili nell'ambito del PNCS per la rilevazione di *Salmonella* devono permettere di ottenere, in caso di esito positivo, l'isolamento del ceppo batterico, da sottoporre successivamente a sierotipizzazione.

Metodi di analisi per la sierotipizzazione

La sierotipizzazione deve essere basata sullo schema di Kauffmann-White- Le Minor.

I metodi di riferimento sono:

- Metodo descritto nel documento ISO/TR 6579-3.
- Metodo alternativo purché validato in accordo alla norma EN/ISO 16140-6 e accreditato dall'organismo nazionale di accreditamento.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Procedura di Prova
SIEROTIPIZZAZIONE MOLECOLARE DI *SALMONELLA* SPP
MEDIANTE SUSPENSION ARRAY PDP BAT 201
Rev. 01 – 07/17

Sierotipizzazione molecolare di *Salmonella* spp. (IZSVe)

PDP BAT 201 Sierotipizzazione molecolare di *Salmonella* spp. mediante suspension array

xMAP® Salmonella Serotyping
Assay Kit



- Identificazione molecolare dei principali sierotipi di *Salmonella* spp. riferibili ai **gruppi somatici B,C1,C2 D, E, G, incluso il sierotipo S. Paratyphi A**, attraverso l'**identificazione della formula antigenica completa**.
- Tale tipizzazione molecolare consiste nell'esecuzione simultanea di tre saggi distinti (**suspension array**) per la determinazione dei geni codificanti per gli antigeni: **somatico (O)**, **ciliare (H)** ed **AT**, saggio che include i marker genici: *sdf* (specifico per *S. Enteritidis*), *fljB* (specifico dei sierotipi bifasici) e *Vi* (specifico per *S. Typhi*).
- Tuttavia, la presente procedura può essere utilizzata anche per **confermare il sierotipo di un ceppo di salmonella precedentemente identificato**, in quest'ultimo caso è possibile limitare la presente procedura all'esecuzione di uno o due saggi.
- La presente procedura si applica esclusivamente ai **ceppi batterici riferibili a *Salmonella* spp.** sulla base delle prove biochimiche precedentemente condotte.

Il metodo è di tipo qualitativo, e, nel caso in cui identifichi una formula antigenica incompleta o parziale, tale metodo di screening deve essere completato con il metodo microbiologico ISO 6579-3:2014 per poter identificare il sierotipo di appartenenza del ceppo in esame





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Sierotipizzazione molecolare di *Salmonella* spp. (IZSVe)

Workflow



Step 1: Extraction

DNA is extracted and quantified from a *Salmonella* isolate using a simple 15 minute extraction method.



Step 2: Multiplex Amplification

Multiplexed PCR with biotinylated primers is performed for each of three tests included in the assay.



Step 3: Bead Hybridization and Detection

Labeled amplicon is hybridized to the appropriate oligonucleotide probe-coupled microsphere mixture and labeled with SAPE reporter.



Step 4: Data Acquisition and Analysis

The assay plate is analyzed on a **Luminex 100/200™** analyzer.

Data generated may be further analyzed via the optional *Salmonella* Analysis Tool to determine serotype based on the Kauffman-White-Le Minor scheme.

Tabella 8: gruppi/antigeni identificati per ciascun saggio

Saggio	Gruppi/Antigeni identificati
Gruppo O	B, C1, C2, D, E, G e sierotipo Paratyphi A
Gruppo H	a, b, c, d, j, (e,h), i, k, r, z10, z, z29, z6, y, L-complex, v, z28, EN-complex, x, z15, 1-complex, 2, 5, 6, 7, G-complex, f, (m/g,m), (m/mt), p, s,t-1*, z51, z4-complex, and z24
AT	sdf (specifico per <i>S. Enteritidis</i>), fljB (controllo positive per seconda fase ciliare H), and Vi (specifico per <i>S. Typhi</i>)

xMAP® *Salmonella* Serotyping Assay™

O Group (alphabetic) H Phase 1 H Phase 2 Serotype

B

Antigenic Formula	Ssp	O Group	O Group (alphabetic)	O Antigen	H Phase 1	H Phase 2	Serotype	Other Phases
e,n,x	I	4	B	4,12	-	e,n,x	Abortusequi	
::1,6	I	4	B	4,12	c	1,6	Abortusovis	
j,i,w	I	4	B	4,12	r,i	l,w	Africana	
::1,6	I	4	B	4,12	i	1,6	Agama	
5,12:f,g,s:[1,2]	I	4	B	[1],4,[5],12	f,g,s	[1,2]	Agona	[R:z27];[R:z45]
10:e,n,x	I	4	B	4,12	z10	e,n,x	Albert	
[2:a:1,7	I	4	B	4,[5],12	a	1,7	Arechavaleta	
[2,[27]:d:z6	I	4	B	[1],4,12,[27]	d	z6	Ayinde	
[2,[27]:j,w:z6	I	4	B	[1],4,12,[27]	l,w	z6	Ayton	
[2,[27]:l,v:1,5	I	4	B	4,[5],12,[27]	l,v	1,5	Azteca	



WHITE-KAUFFMANN-LE MINOR SCHEME informatico



Altra metodica in commercio

Principio del metodo:

- Riconoscimento di sequenze di DNA target da parte di sonde che contengono dei codici unici (ZIP) e successiva amplificazione con primer universali.
- L'amplificazione si verifica solo se c'è un appaiamento perfetto tra sonda e target.
- I prodotti di amplificazione vengono fatti ibridizzare con un supporto di microarray (Arraytube) e visualizzati tramite lettura colorimetrica.
- Un software analizza l'immagine di array e genera il risultato oggettivo.

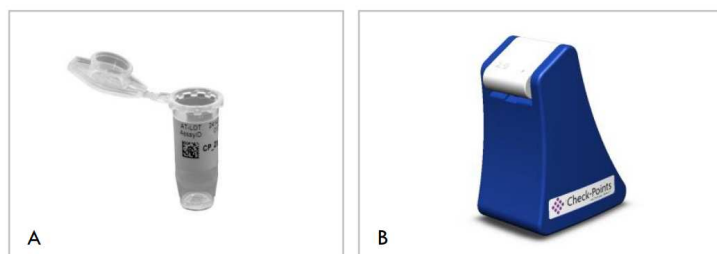
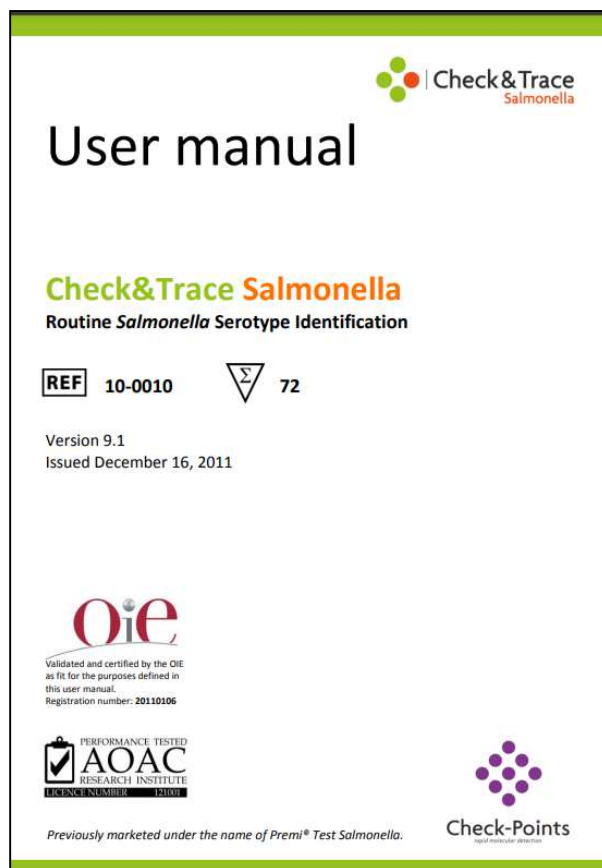
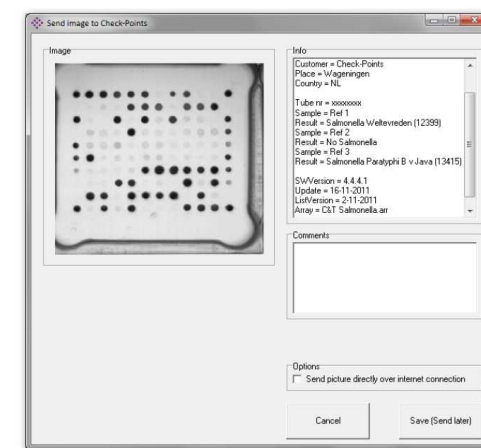


Figure 2: A) the CP Array Tube (AT) and B) the Check-Points Tube Reader.

Note:

- The ArrayTube™ DNA microarray platform (see figure 2) is sold under licence from Alere Technologies GmbH.

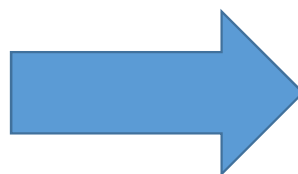
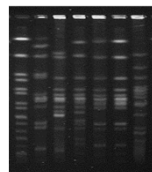




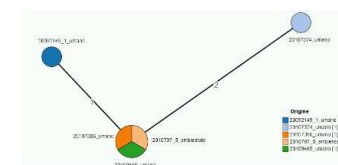
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Metodiche di caratterizzazione genomica

PFGE Pulsed Field Gel Electrophoresis



WGS Whole Genome Sequencing (NGS)



Applicazioni del WGS su *Salmonella* spp.

- Predizione *in silico* del profilo antigenico e del sierotipo
Es: SeqSero2 (Zhang et al., 2019)
- Identificazione dei geni di antibiotico resistenza
Es: ResFinder
- Identificazione del Sequence Type Es: MLST
- Identificazione del core genome MLST
Es: cgMLSTFinder v1.2

Enterobase (Achtman et al., 2020) è il database di riferimento

Enterobase Log In Register Help v1.1.3

Available Databases

Salmonella	Escherichia/Shigella	Mycobacterium
Strains: 375158	Strains: 234836	Strains: 93517
Assembled <ul style="list-style-type: none">• Legacy: 4933• From NGS: 370225• In Progress: 0 Schemes <ul style="list-style-type: none">• Achtman 7 Gene MLST: 375105• cgMLST V2 + HierCC V1: 370342• rMLST: 370051• wgMLST: 369980	Assembled <ul style="list-style-type: none">• Legacy: 9823• From NGS: 225313• In Progress: 6 Schemes <ul style="list-style-type: none">• Achtman 7 Gene MLST: 234820• cgMLST V1 + HierCC V1: 225638• rMLST: 225302• wgMLST: 225240	<p>PLEASE NOTE: This database is much less developed and much less reliable than other Enterobase databases. The data requires curation. The wgMLST scheme needs to be validated. The cgMLST scheme needs to be updated and validated.</p> Assembled <ul style="list-style-type: none">• From NGS: 93517• In Progress: 0
Database Home	Database Home	Database Home

