

DETERMINAZIONE DEGLI ENTEROBATTERI PATOGENI: *SALMONELLA*

0. Generalità e definizioni

Il genere *Salmonella* comprende microrganismi bastoncellari appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae, gram negativi, aerobi e anaerobi facoltativi, non fermentanti il lattosio, saccarosio e salicina. La morfologia è simile a quella degli altri enterobatteri; sono mobili per la presenza di flagelli peritrichi (eccetto i sierotipi *S. gallinarum* e *S. pullorum* che sono immobili). La maggior parte forma fimbrie; alcuni ceppi del sierotipo *S. enteritidis* e *S. typhimurium* producono fimbrie sottili, la cui presenza può renderli inagglutinabili con i sieri anti O. Ad oggi sono riconosciuti 2300 sierotipi di *Salmonella*, differenziabili sulla base dei diversi caratteri antigenici, antigeni somatici (O), capsulari (Vi) e gli antigeni flagellari (H) che fanno parte rispettivamente della fase I e fase II. I diversi sierotipi sono catalogati secondo lo schema di Kauffmann White dove ognuno viene definito come specie distinta e denominato sulla base della patologia sostenuta o della sorgente (geografica, animale) del primo isolamento.

Le salmonelle parassitano l'intestino dell'uomo, degli animali domestici e selvatici; talvolta possono essere isolate dal sangue e dagli organi interni dei vertebrati. L'acidità gastrica è un importante meccanismo di difesa. Tuttavia, alcune specie possono sopravvivere e penetrare nell'epitelio intestinale, anche se solo *S. typhi* è sistematicamente invasiva. Possono essere responsabili di diffuse ed ubiquitarie patologie nell'uomo, causate da sierotipi ubiquitari ampiamente diffusi negli animali di allevamento (salmonellosi minori). In questo caso, le gastroenteriti sono le manifestazioni morbose che si osservano con maggiore frequenza e sono associate all'ingestione di cibi e acqua contaminati. La malattia si manifesta di solito con diarrea ed enterocolite di modesta gravità (tranne nei soggetti anziani, nei defedati, negli immunocompromessi e nei bambini) e, generalmente, tende ad una guarigione spontanea. Numerosi possono comunque essere i portatori sani. Salmonellosi sistemiche (tifo e paratifi), trasmesse direttamente da uomo ad uomo attraverso il circuito fecale-orale, sono invece causate esclusivamente da sierotipi adattati all'uomo (*Salmonella typhi*, e *S. paratyphi* A, ecc.). In genere sono di modesta gravità ma, in assenza di una adeguata terapia, possono occasionalmente essere anche mortali.

La dose infettante è in funzione del sierotipo e delle condizioni dell'ospite e in genere varia da 10^7 a 10^9 . Il periodo di incubazione dell'infezione è variabile e di norma è di 1-8 giorni con una durata di 2-10 giorni.

La presenza di salmonelle nell'ambiente idrico è indice di una contaminazione fecale primaria (immissione diretta di scarichi fognari) o secondaria (ad esempio, dilavamento da suoli contaminati). Salmonelle si trovano frequentemente nei liquami, in acque costiere, lacustri e nel suolo dove si moltiplicano però in maniera non significativa. In acque trattate e disinfettate la presenza di *Salmonella* spp., e di *S. typhi* in particolare, è estremamente rara e comunque generalmente da associare a carenze dei processi di trattamento delle acque. La clorazione, infatti, è tuttora considerata un'efficace misura di prevenzione. Le salmonelle comunque, in condizioni ambientali favorevoli, possono sopravvivere per settimane in ambiente idrico e per mesi nel terreno. Sono, generalmente, in numero ridotto rispetto agli indicatori di contaminazione fecale e variabili in funzione delle patologie diffuse all'interno della popolazione. Il loro rilevamento nelle acque richiede l'esame di volumi di acqua relativamente elevati. In Italia, *S. infantis*, *S. typhimurium*, *S. derby*, *S. veneziana* sono i sierotipi più frequentemente diffusi ed isolati da fonti ambientali.

Molte osservazioni sulla resistenza di *Salmonella* a sostanze chimiche sono derivate dal tentativo di trovare terreni selettivi e di arricchimento per il suo isolamento da campioni contenenti altri enterobatteri. Alcuni coloranti, come il verde brillante e il verde malachite sono utilizzati per l'isolamento della maggior parte dei sierotipi, anche se i sali biliari sono di uso comune nella

preparazione di molti terreni selettivi solidi. Le esigenze nutrizionali sono relativamente modeste, si moltiplicano facilmente nei terreni di coltura, negli alimenti, nelle acque e in pochi minuti vengono uccise dall'esposizione al calore già ad una temperatura di 60°.

Nelle procedure d'isolamento esistono variazioni e limitazioni causate dalla diversa sensibilità e selettività dei 2300 sierotipi di *Salmonella* oggi riconosciuti.

Salmonella deve essere ricercata nelle acque destinate al consumo umano nell'ambito della verifica del parametro Enterobatteri patogeni, inserito tra quelli elencati nel paragrafo Avvertenza dell'Allegato I del Decreto Legislativo n. 31 del 2001. Quale patogeno umano, *Salmonella* deve essere obbligatoriamente assente nelle acque destinate al consumo umano.

1. Campo di applicazione

Le procedure di analisi vengono utilizzate per il rilevamento di *Salmonella* nelle acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinarsi al consumo umano.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo 1

2.1.1. Principio del metodo

Il metodo consente di valutare la Presenza/Assenza di *Salmonella* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che comprendono: Prearricchimento, Arricchimento, Isolamento, Conferma biochimica, ed eventualmente, Conferma sierologica.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice 1).

2.1.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 1000 mL, è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Acqua peptonata tamponata

Composizione	
Peptone	10 g
Cloruro di sodio	5 g
Fosfato di sodio bibasico dodecaidrato	9 g
Fosfato di potassio monobasico	1,5 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,2±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Dopo aver sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100

Versione on-line su sito www.iss.it

mL/beuta e sterilizzare per 15 minuti a $121\pm 3^\circ$. Conservare a $5\pm 3^\circ$ per non più di due settimane in condizioni ottimali.

L'acqua peptonata favorisce la rivitalizzazione delle cellule batteriche.

2.1.4.2. Brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis

Composizione	
Peptone di soia	4,5 g
Cloruro di sodio	7,2 g
Fosfato di potassio monobasico	1,26 g
Potassio fosfato bibasico	180 mg
Cloruro di magnesio	13,4 g
Verde malachite ossalato	36 mg
Acqua distillata	1000 mL
pH $5,2\pm 0,2$	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo) e sterilizzare per 15 minuti a $115\pm 3^\circ$. Conservare a $5\pm 3^\circ$ per non più di una settimana in condizioni ottimali.

Il brodo di Rappaport Vassiliadis presenta spiccata attività inibitoria verso la flora saprofitica, associata ad una buona capacità di stimolare la crescita delle salmonelle. Inibisce comunque la crescita di *S. typhi* alla temperatura di 42° . Il substrato contiene magnesio cloruro, classificato come irritante (Xi). Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.1.4.3. Hektoen Enteric Agar

Composizione	
Triptone	12 g
Estratto di lievito	3 g
Sali biliari n. 3	9 g
Lattosio	12 g
Saccarosio	12 g
Salicina	2 g
Cloruro di sodio	5 g
Tiosolfato di sodio	5 g
Citrato ferrico ammoniacale	1,5 g
Agar	15 g
Blu di bromotimolo	65 mg
Fucsina acida	0,1 g
Acqua distillata	1000 mL
pH $7,4\pm 0,2$	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Non sterilizzare. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a $5\pm 3^\circ$ per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento di *Salmonella*, che garantiscono buoni risultati in fase analitica, tuttavia non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutti i sierotipi di *Salmonella* eventualmente presenti.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e come controllo negativo *Enterococcus faecalis* ATCC 19433.

2.1.4.4. Triptone Soia Agar

Composizione	
Triptone	15 g
Peptone di soia	5 g
Cloruro di sodio	5 g
Agar	20 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,3±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare a 121±3° per 15 minuti.

Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a 5±3° per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.1.4.5. Soluzione di tetrametilparafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione	
N,N,N',N'- tetrametilparafenilendiamina dicloridrato	1 g
Acqua distillata	100 mL

Dischetti o tamponi adatti all'uso sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto viene classificato, ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

2.1.4.6. Agar al ferro di Kliger

Composizione	
Estratto di carne	3 g
Estratto di lievito	3 g
Peptone	20 g
Cloruro di sodio	5 g
Lattosio	10 g
Glucosio	1 g
Ferro citrato	0,3 g
Tiosolfato di sodio	0,3 g
Agar	12 g
Rosso fenolo	50 mg
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,4±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo e, dopo sterilizzazione a 121±3° per 15 minuti, lasciare solidificare su un piano inclinato per ottenere una superficie a becco di clarino.

Conservare a 5±3° per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.1.4.7. Agar al ferro e lisina

Composizione	
Casitone	5 g
Estratto di lievito	3 g
Destrosio	1 g
L-lisina	10 g
Ferro ammonio citrato	0,5 g
Agar	14,5 g
Tiosolfato di sodio	40 mg
Porpora di bromocresolo	20 mg
Acqua distillata	1000 mL
pH 6,2±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa dissoluzione dei componenti. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo e, dopo sterilizzazione a 121±3° per 15 minuti, lasciare solidificare su un piano inclinato per ottenere una superficie a becco di clarino.

Conservare a 5±3° per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e come controllo negativo *Shigella flexneri* ATCC 12022.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Fase di prearricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo. Filtrare almeno 1000 mL di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro (porosità nominale 0,45 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se necessario, per la presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua peptonata tamponata (2.1.4.1.). Incubare a 36±1° per 18-24 ore.

2.1.5.2. Fase di arricchimento

Dal brodo di prearricchimento (2.1.4.1.) eseguire l'inoculo, in rapporto di 1:100, di un'aliquota della brodocultura in brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis (2.1.4.2.). Incubare a 42±1° per 24+24 ore.

A questa temperatura e per la presenza nel brodo del verde malachite, *S. typhi* non cresce. La sua ricerca può essere effettuata in brodo alla selenite il cui uso, tuttavia, per l'elevata tossicità del prodotto, richiede precauzioni particolari ed l'applicazione di speciali procedure da parte degli operatori sia nella fase di manipolazione sia in quella di smaltimento.

2.1.5.3. Fase di isolamento ed identificazione delle colonie

Prelevando un'ansata dal brodo di arricchimento (2.1.4.2.), eseguire 2 subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento Hektoen Enteric Agar (2.1.4.3.): la prima dopo 24 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 48 ore d'incubazione.

Incubare a 36±1° per 22±2 ore. Il terreno permette di distinguere facilmente la flora che fermenta lattosio, saccarosio e salicina da *Salmonella* che non fermenta questi zuccheri. Le colonie di *Salmonella* si presentano di colore verde-blu o blu; può essere presente un centro nero caratteristico con viraggio del terreno al blu. *Shigella* cresce come colonia verde chiaro senza viraggio del terreno. I coliformi crescono come colonie color salmone ed il terreno vira

al rosa tendente all'arancio e si opacizza per la precipitazione dei sali biliari. Le specie di *Proteus* che fermentano la salicina ed il saccarosio si sviluppano come colonie rosa-salmone, mentre le specie di *Proteus* non fermentanti crescono come colonie verdi e blu con o senza centro nero. L'analogia morfologica delle colonie di *Proteus* con quelle di *Salmonella* può ingenerare difficoltà nella distinzione primaria del microrganismo target.

2.1.5.4. Conferma biochimica

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie sospette al genere *Salmonella* è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma: prova della presenza della citocromossidasi, della fermentazione dei carboidrati e della decarbossilazione della lisina. È possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio.

Prima di effettuare le prove di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Triptone Soia Agar (2.1.4.4.) incubando a $36\pm 1^\circ$ per 21 ± 3 ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.1.5.5. Prova della citocromossidasi

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Triptone Soia Agar (2.1.4.4.). Strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.1.4.5.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio.

Una reazione negativa si evidenzia quando non si produce alcuna colorazione; se positiva si sviluppa entro pochi secondi una colorazione blu-violetto. Le salmonelle sono ossidasi-negative.

2.1.5.6. Prova della fermentazione dei carboidrati

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno Triptone Soia Agar (2.1.4.4.), la colonia sospetta e, per infissione e successivo strisciamento, trasferire sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro di Kligler (2.1.4.6.). Incubare a $36\pm 1^\circ$ per 18-24 ore. È essenziale che i risultati siano registrati dopo 18-24 ore di incubazione.

Nella tabella 1 sono riportate le caratteristiche di crescita su Kligler Iron Agar per alcuni microrganismi. Reazioni acide producono una colorazione gialla del terreno, quelle alcaline sono evidenziabili dal viraggio del terreno al porpora. Gli stipiti che producono idrogeno solforato determinano un annerimento del terreno.

Tabella 1 - Tipo di reazione prodotta da alcuni microrganismi dall'utilizzazione dei carboidrati su Kligler Iron Agar

Microrganismo	superficie inclinata	fondo	H ₂ S
	Tipo di reazione	Tipo di reazione	Tipo di reazione
<i>Escherichia</i>	Acida/alcalina	Acida con gas /alcalina	variabile
<i>Klebsiella</i>	Acida	Acida con gas	-
<i>Enterobacter</i>	Acida	Acida /con gas	-
<i>Citrobacter</i>	Acida/alcalina	Acida /con gas	+
<i>Salmonella paratyphi</i>	Acida/alcalina	Acida	-
<i>Salmonella spp.</i>	Alcalina	Acida /con gas	+
<i>Salmonella arizonae</i>	Alcalina	Acida /con gas	+
<i>Proteus morgani</i>	nessuna	Acida	-
<i>Proteus vulgaris</i>	nessuna	Acida	+
<i>Shigella</i>	nessuna	Acida	-

Versione on-line su sito www.iss.it

2.1.5.7. Prova della decarbossilazione della lisina

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno Triptone Soia Agar (2.1.4.4.), la colonia sospetta e, per infissione e successivo strisciamento, trasferire sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro e lisina (2.1.4.7.). Incubare a $36\pm 1^\circ$ per 18-24 ore.

I microrganismi, appartenenti al genere *Salmonella* producono una reazione alcalina color viola sia nel becco sia nel cilindro; invece, una reazione acida di colore giallo indica una reazione negativa. Gli stipti che producono idrogeno solforato determinano un annerimento del terreno per la precipitazione di solfuro di ferro.

2.1.5.8. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* possono essere tipizzati in base alla classificazione di Kauffmann-White utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stipti ai centri di riferimento per la *Salmonella*. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai test specifici.

2.1.6. Espressione dei risultati

Considerare prodotte da *Salmonella* le colonie che sono state individuate sulla base delle caratteristiche colturali e biochimiche.

Riportare il risultato ottenuto come *Salmonella* Assente o Presente in 1 L e, se del caso, il sierotipo individuato.

2.2. Metodo 2

2.2.1. Principio del metodo

Il metodo consente di valutare la Presenza/Assenza di *Salmonella* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che comprendono: Prearricchimento, Arricchimento, Isolamento, Conferma biochimica ed eventualmente Conferma sierologica.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice 1)

2.2.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 1000 mL, è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.2.4. Terreni di coltura e reagenti

2.2.4.1. Acqua peptonata tamponata

Composizione	
Peptone	10 g
Cloruro di sodio	5 g
Fosfato di sodio bibasico dodecaidrato	9 g
Fosfato di potassio monobasico	1,5 g

Acqua distillata	1000 mL
pH 7,2±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Dopo aver sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare per 15 minuti a 121±3°. Conservare a 5±3° per non più di due settimane in condizioni ottimali.

L'acqua peptonata favorisce la rivitalizzazione delle cellule batteriche.

2.2.4.2. Brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis

Composizione	
Peptone di soia	4,5 g
Cloruro di sodio	7,2 g
Fosfato di potassio monobasico	1,26 g
Potassio fosfato bibasico	180 mg
Cloruro di magnesio	13,4 g
Verde malachite ossalato	36 mg
Acqua distillata	1000 mL
pH 5,2±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo) e sterilizzare per 15 minuti a 115±3°. Conservare a 5±3° per non più di una settimana in condizioni ottimali.

Il brodo di Rappaport Vassiliadis presenta spiccata attività inibitoria verso la flora saprofito, associata ad una buona capacità di stimolare la crescita delle salmonelle. Inibisce comunque la crescita di *S. typhi* alla temperatura di 42°. Il substrato contiene magnesio cloruro, classificato come irritante (Xi).

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.2.4.3. Terreno di base Chromogenic Salmonella Agar

Composizione	
Peptone	10 g
Miscela di inibitori	12 g
Miscela di cromogeni	0,9 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Aggiungere il supplemento A (2.2.4.4.). Portare ad ebollizione sotto agitazione. Sterilizzare a 121±3° per 15 minuti. Raffreddare alla temperatura di 50±5°. Aggiungere il supplemento B (2.2.4.5.) in condizioni asettiche. Mescolare con cura.

Il preparato è classificato come irritante (Xi) per la presenza di sodio desossicolato e sodio tiosolfato. Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

2.2.4.3. Supplemento A

Composizione		
Agenti emulsionanti	11,4	mL

Versione on-line su sito www.iss.it

Aggiungere, ad 1 L di terreno di base (2.2.4.2.), 11,4 mL di supplemento. Mescolare accuratamente e portare ad ebollizione sotto agitazione. Sterilizzare a $121\pm 3^\circ$ per 15 minuti.

2.2.4.4. Supplemento B

Composizione		
Cefsulodina	5	mg
Acqua distillata sterile	2	mL

Sciogliere il supplemento in 2 mL di acqua distillata sterile.

Aggiungere, in condizioni di asepsi, il supplemento ad 1 L di terreno (2.2.4.2.) addizionato del supplemento A e sterilizzato.

2.2.4.5. Terreno completo Chromogenic Salmonella Agar

Composizione		
Terreno di base (2.2.4.2.)	1000	mL
Supplemento A (2.2.4.3.)	11,4	mL
Sol. di supplemento B (2.2.4.4.)	2	mL
pH $7,2\pm 0,2$		

Dopo avere aggiunto i supplementi al terreno di base, distribuire in capsule di Petri. Lasciare solidificare. Conservare a $5\pm 3^\circ$ per non più di una settimana.

La selettività del terreno è garantita da una miscela di inibenti, che comprendono:

- cefalosporina, attiva nell'inibizione della crescita di *Pseudomonas* spp.,
- sali biliari, attivi nella soppressione dei batteri Gram positivi e di alcuni Gram negativi,
- Tergitol 4, inibitore nella crescita del *Proteus* spp.

Il terreno è adatto anche per l'isolamento di *Salmonella paratyphi* e di *S. typhi*, provenienti da campioni alimentari, clinici ed ambientali. Il sistema selettivo-differenziale del terreno permette di isolare anche i rari ceppi di *Salmonella* fermentanti il lattosio.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e come controllo negativo *Ps. aeruginosa* ATCC 27853.

2.2.4.6. Triptone Soia Agar

Composizione	
Triptone	15 g
Peptone di soia	5 g
Cloruro di sodio	5 g
Agar	20 g
Acqua distillata	1000 mL
pH $7,3\pm 0,2$	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare a $121\pm 3^\circ$ per 15 minuti. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a $5\pm 3^\circ$ per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.2.4.7. Soluzione di tetrametilparafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione	
N,N,N',N'-	1 g

tetrametilparafenilendiamina dicloridrato	
Acqua distillata	100 mL

Dischetti o tamponi adatti all'uso sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto viene classificato, ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Fase di prearricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo. Filtrare almeno 1000 mL di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro (porosità nominale 0,45 μ m) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se necessario, per la presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua peptonata tamponata (2.2.4.1.). Incubare a $36\pm 1^\circ$ per 18-24 ore.

2.2.5.2. Fase di arricchimento

Dal brodo di prearricchimento (2.2.4.1.) eseguire l'inoculo, in rapporto di 1:100, di un'aliquota della brodocultura in brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis (2.2.4.2.). Incubare a $42\pm 1^\circ$ per 24+24 ore.

A questa temperatura e per la presenza nel brodo del verde malachite, *S. typhi* non cresce. La sua ricerca può essere effettuata in brodo alla selenite il cui uso, tuttavia, per l'elevata tossicità del prodotto, richiede precauzioni particolari e l'applicazione di speciali procedure da parte degli operatori sia nella fase di manipolazione sia in quella di smaltimento.

2.2.5.3. Fase di isolamento ed identificazione delle colonie

Prelevando un'ansata dal brodo di arricchimento (2.2.4.1.), eseguire 2 subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento *Chromogenic Salmonella Agar* (2.2.4.3.): la prima dopo 24 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 48 ore.

Incubare a $36\pm 1^\circ$ per 22 ± 2 ore. Le colonie sospette di *Salmonella*, *Salmonella* lac+ e *Salmonella typhi* si presentano di colore rosso-magenta. Le colonie di *E. coli*, oltre ad avere una crescita scarsa, si presentano incolori ed *Enterobacter* e *Klebsiella*, che crescono con difficoltà, presentano colonie di colore verde-blu. *Pseudomonas* spp. è generalmente inibito, come pure i batteri Gram-positivi. Raramente *Pseudomonas* e *Aeromonas* crescono come colonie di colore rosso-magenta. *Proteus* spp. presenta una crescita scarsa e le colonie eventualmente presenti sono di colore marrone chiaro o verde.

2.2.5.4. Conferma biochimica

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie sospette al genere *Salmonella* è opportuno procedere allo svolgimento della prova della citocromossidasi per distinguere i rari ceppi di *Pseudomonas* e *Aeromonas* che formano colonie di colore rosso-magenta. È possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio.

Prima di effettuare la prova di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Triptone Soia Agar (2.2.4.6.) incubando a $36\pm 1^\circ$ per 21 ± 3 ore. Eseguire la prova su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

Versione on-line su sito www.iss.it

2.2.5.5. Prova della citocromossidasi

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Triptone Soia Agar (2.2.4.6.). Strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.2.4.7.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio.

Una reazione negativa si evidenzia quando non si produce alcuna colorazione; se positiva si sviluppa entro pochi secondi una colorazione blu-violetto. Le salmonelle sono ossidasi-negative.

2.2.5.6. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* possono essere tipizzati in base alla classificazione di Kauffmann-White utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stipti ai centri di riferimento per la *Salmonella*. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai test specifici.

2.2.6. Espressione dei risultati

Considerare prodotte da *Salmonella* le colonie che sono state individuate sulla base delle caratteristiche colturali e biochimiche.

Riportare il risultato ottenuto come *Salmonella* Assente o Presente in 1 L e, se del caso, il sierotipo individuato.

2.3. Metodo 3

2.3.1. Principio del metodo

Il metodo consente di valutare la Presenza/Assenza di *Salmonella* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che comprendono: Prearricchimento, Arricchimento, Isolamento, Conferma biochimica, ed eventualmente, Conferma sierologica.

2.3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice 1).

2.3.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 1000 mL, è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.3.4. Terreni di coltura e reagenti

2.3.4.1. Acqua peptonata tamponata

Composizione	
Peptone	10 g
Cloruro di sodio	5 g
Fosfato di sodio bibasico dodecaidrato	9 g
Fosfato di potassio monobasico	1,5 g

Acqua distillata	1000 mL
pH 7,2±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Dopo aver sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare per 15 minuti a 121±3°. Conservare a 5±3° per non più di due settimane in condizioni ottimali.

L'acqua peptonata favorisce la rivitalizzazione delle cellule batteriche.

2.3.4.2. Brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis

Composizione	
Peptone di soia	4,5 g
Cloruro di sodio	7,2 g
Fosfato di potassio monobasico	1,26 g
Potassio fosfato bibasico	180 mg
Cloruro di magnesio	13,4 g
Verde malachite ossalato	36 mg
Acqua distillata	1000 mL
pH 5,2±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo) e sterilizzare per 15 minuti a 115±3°. Conservare a 5±3° per non più di una settimana in condizioni ottimali.

Il brodo di Rappaport Vassiliadis presenta spiccata attività inibitoria verso la flora saprofitica, associata ad una buona capacità di stimolare la crescita delle salmonelle. Inibisce comunque la crescita di *S. typhi* alla temperatura di 42°. Il substrato contiene magnesio cloruro, classificato come irritante (Xi). Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.3.4.3. Agar Rambach

Composizione	
Peptone	8 g
Cloruro di sodio	5 g
Desossicolato di sodio	1 g
Miscela cromogena	1,5 g
Glicol propilenico	10,5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,3±0,2	

Il terreno si trova in commercio e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice.

In funzione della quantità di terreno da preparare, aggiungere un volume di acqua distillata alla miscela cromogena già pronta nella confezione. Agitare fino alla completa dissoluzione dei componenti. Aggiungere la fiala del terreno disidratato e riscaldare agitando frequentemente. Il tempo di solubilizzazione di una sospensione di 250 mL è di 20-25 minuti; per la solubilizzazione di 1000 mL di terreno sono necessari 35-40 minuti. Non sterilizzare, non surriscaldare. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare.

Conservare ad una temperatura non inferiore a 6° per non più di tre settimane in condizioni ottimali.

Versione on-line su sito www.iss.it

Il substrato è classificato come tossico nocivo (Xn) e irritante (Xi) per la presenza di sodio desossicolato e Tris(idrossimetil-aminometano). Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

2.3.4.4. **Tryptone Soia Agar**

Composizione	
Tryptone	15 g
Peptone di soia	5 g
Cloruro di sodio	5 g
Agar	20 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,3±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare a 121±3° per 15 minuti.

Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a 5±3° per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.3.4.5. **Soluzione di tetrametilparafenilendiamina dicloridrato all'1%**

Composizione	
N,N,N',N'- tetrametilparafeinilendiamina diamina dicloridrato	1 g
Acqua distillata	100 mL

Dischetti o tamponi adatti all'uso sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto viene classificato, ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

2.3.5. **Procedura**

2.3.5.1. **Fase di prearricchimento**

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo. Filtrare almeno 1000 mL di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro (porosità nominale 0,45 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se necessario, per la presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua peptonata tamponata (2.3.4.1.). Incubare a 36±1° per 18-24 ore.

2.3.5.2. **Fase di arricchimento**

Dal brodo di prearricchimento (2.3.4.1.) eseguire l'inoculo, in rapporto di 1:100, di un'aliquota della brodocultura in brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis (2.3.4.2.). Incubare a 42±1° per 24+24 ore.

A questa temperatura e per la presenza nel brodo del verde malachite, *S. typhi* non cresce. La sua ricerca può essere effettuata in brodo alla selenite il cui uso, tuttavia, per l'elevata tossicità

del prodotto, richiede precauzioni particolari e l'applicazione di speciali procedure da parte degli operatori sia nella fase di manipolazione sia in quella di smaltimento.

2.3.5.3. Fase di isolamento ed identificazione delle colonie

Prelevando un'ansata dal brodo di arricchimento (2.3.4.2.), eseguire 2 subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento *Rambach Agar* (2.3.4.3.): la prima dopo 24 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 48 ore.

Incubare a $36\pm 1^\circ$ per 24-48 ore. Sul terreno le colonie di *Salmonella enteritidis* e *S. typhimurium* crescono come colonie rosse; *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* si presentano con colonie verdi-blu. *Proteus mirabilis* e *Shigella flexneri* formano colonie beige, mentre *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* sono inibiti.

2.3.5.4. Conferma biochimica

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie sospette al genere *Salmonella* è opportuno procedere allo svolgimento della prova della citocromossidasi. È possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio.

Prima di effettuare la prova è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Triptone Soia Agar (2.3.4.4.) incubando a $36\pm 1^\circ$ per 21 ± 3 ore. Eseguire la prova su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.3.5.5. Prova della citocromossidasi

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Triptone Soia Agar (2.3.4.4.). Strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.3.4.5.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio.

Una reazione negativa si evidenzia quando non si produce alcuna colorazione; se positiva si sviluppa entro pochi secondi una colorazione blu-violetto. Le salmonelle sono ossidasi-negative.

2.3.6. Espressione dei risultati

Considerare prodotte da *Salmonella* le colonie che sono state individuate sulla base delle caratteristiche colturali e biochimiche.

Riportare il risultato ottenuto come *Salmonella* Assente o Presente in 1 L e, se del caso, il sierotipo individuato.

BIBLIOGRAFIA

American Public Health Association. Standard methods for the Examination of Water and Wastewater. A.P.H.A., A.W.W.A. (Ed.), 18th ed. Washington D.C.: APHA, 1992. 1200 p.

WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella Michel Y. Popoff and Léon Le Minor Formules Antigeniques des Servovars de Salmonella 2001.

Ottaviani M., Bonadonna L., Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano Vol. II Parte 2. Metodi microbiologici. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/14).