

DETERMINAZIONE DEGLI ENTEROBATTERI PATOGENI: **SHIGELLA**

0. Generalità e definizioni

Il genere *Shigella* comprende microrganismi bastoncellari di dimensioni di $0,7-1,5 \times 2-5 \mu\text{m}$, appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, gram negativi, non mobili, aerobi e anaerobi facoltativi con metabolismo sia respiratorio, sia fermentativo. Le shigelle fermentano solo pochi carboidrati senza produzione di gas e idrogeno solforato.

Sono patogeni intestinali per l'uomo e per gli altri primati e agenti eziologici della dissenteria bacillare. La dose minima infettante è bassa ed è pari a 10^1-10^2 organismi. La trasmissione dell'infezione può avere luogo per contatto diretto o per ingestione di alimenti e acqua contaminati. I sintomi sono evidenti dopo circa 12-96 ore. Numerosi possono comunque essere i casi asintomatici. La malattia, che ha una durata di circa 4-7 giorni, si manifesta di solito con diarrea, nausea e vomito di limitata gravità (tranne nei soggetti anziani, nei defedati, negli immunocompromessi, nei malati di AIDS e nei bambini).

Nel genere sono comprese 4 specie o sottogruppi all'interno dei quali sono distinguibili uno o più sierotipi. La classificazione si basa su caratteristiche biochimiche ed antigeniche e permette di distinguere:

Sottogruppo A: *Shigella dysenteriae*. Non fermenta la mannite, comprende 12 sierotipi diversi in cui sono inclusi microrganismi originariamente denominati *Sh. schmitzii*, *Sh. ambigua*, *Sh. arabinotarda* e shigelle del gruppo *Largei-Sachs*.

Sottogruppo B: *Shigella flexneri*. Fermenta la mannite. Comprende 11 sierotipi in cui sono inclusi i bacilli originariamente indicati come paradissenterici, quali *Sh. saigonensis*, *Sh. newcastle* e *Sh. rio*.

Sottogruppo C: *Shigella boydii*. Fermenta la mannite e si differenzia dal sottogruppo B per altri caratteri biochimici oltre che antigenicamente. Comprende 18 sierotipi.

Sottogruppo D: *Shigella sonnei*. Fermenta la mannite e, lentamente, il lattosio. Comprende due varietà sierologiche.

Le shigelle posseggono antigeni somatici (O) di natura lipopolisaccaridica. Essendo immobili sono sprovviste di cilia, e pertanto non sono dotate di antigene ciliare, ma possono presentare, nonostante la mancanza della capsula, un antigene K termolabile, che può inibire l'agglutinazione degli antigeni somatici con gli antisieri corrispondenti. Oltre alla endotossina di natura polipeptido-lipidopolisaccaridica, *Shigella dysenteriae* produce una potente esotossina: è l'unico caso tra le *Enterobacteriaceae*.

L'isolamento di *Shigella* da acque superficiali e potabili non è frequente; i membri del gruppo non si riscontrano frequentemente né negli scarichi né in acque fecalizzate. Infatti, il microrganismo risulta essere molto sensibile alle condizioni ostili del mezzo acquoso, all'antagonismo di microrganismi interferenti e, soprattutto, presenta una particolare sensibilità ai trattamenti di disinfezione. *Shigella* è infatti inattivata con 0,05 mg/L di cloro in 10 minuti. Qualora venga rilevata nelle acque potabili, la sua presenza può essere messa in relazione ad inefficienza dei trattamenti (in particolare alla disinfezione) ed a marcate carenze del sistema di distribuzione.

Shigella 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, come sostituito dal Decreto Legislativo n. 27 del 2002. Quale patogeno umano, *Shigella* deve essere obbligatoriamente assente nelle acque destinate al consumo umano.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per il rilevamento di *Shigella* nelle acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinare 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 *Shigella* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che possono comprendere: Arricchimento, Isolamento ed, eventualmente, Conferma biochimica e 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 1 L, 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. Brodo GN Hajna

Composizione	
Triptoso	20 g
Glucosio	1 g
D-Mannitolo	2 g
Sodio citrato	5 g
Sodio desossicolato	0,5 g
Fosfato dipotassio	4 g
Fosfato monopotassio	1,5 g
Sodio cloruro	5 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±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 agitando frequentemente. Dopo avere sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare in autoclave a 121±3°C per 15 min. Conservare a 5±3°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

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

2.1.4.2. Xilosio Lisina Desossicolato Agar

Composizione	
Xilosio	3,5 g
L-Lisina	5 g
Lattosio	7,5 g
Saccarosio	7,5 g
Cloruro di sodio	5 g
Estratto di lievito	3 g
Desossicolato di sodio	2,5 g
Tiosolfato di sodio	6,8 g
Citrato di ferro ammoniacale	0,8 g
Rosso fenolo	0,08 g
Agar	15
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,4±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 eccedere nel riscaldamento e non sterilizzare. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di una settimana in condizioni ottimali.

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

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

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Shigella flexneri* ATCC 12022 e come controllo negativo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

2.1.4.3. Agar nutritivo

Composizione	
Estratto di carne	3 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH $6,8\pm 0,2$	

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 in autoclave a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.1.4.4. Agar al ferro di Kliger

Composizione	
Estratto di carne	3 g
Estratto di lievito	3 g
Peptone	20 g
Sodio cloruro	5 g
Lattosio	10 g
Glucosio	1 g
Ferro citrato	0,3 g
Sodio tiosolfato	0,3 g
Rosso fenolo	50 mg
Agar	12 g
Acqua distillata	1000 mL
pH $7,4\pm 0,2$	

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. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo e sterilizzare in autoclave a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 min. Lasciare solidificare su un piano inclinato per ottenere una superficie a becco di clarino.

Conservare a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Shigella flexneri* ATCC 12022 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922.

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, a norma della direttiva del Consiglio 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

2.1.4.6. Reattivo MUCAP

Prodotto brevettato disponibile in commercio contenente un estere a otto atomi di carbonio coniugato con metilumbelliferone in solvente organico. Conservare il reattivo a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ in condizioni ottimali fino alla data di scadenza. Il prodotto è infiammabile; conservare e manipolare con le dovute precauzioni.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Fase di arricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo.

Rispettando le comuni norme di asepsi, filtrare almeno 1 L di campione su una membrana di 47 mm di diametro con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di $0,45\ \mu\text{m}$ (pori simmetrici da $0,45\ \mu\text{m}$ oppure pori asimmetrici da $0,7/0,2\ \mu\text{m}$). Se è necessario, per la presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL del brodo di arricchimento (2.1.4.1.) e incubare a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per un periodo compreso tra le 6 e le 24 ore.

2.1.5.2. Fase di isolamento

Dal brodo di arricchimento eseguire, prelevando un'ansata, preferibilmente, 2 subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento (2.1.4.2.): la prima dopo 6-12 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 18-24 ore. Incubare a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 20-24 ore.

Su Xilosiso Lisina Desossicolato le colonie sospette di *Shigella* si presentano rosse, C 8 esterasi negative. Anche *Proteus inconstans*, *Proteus rettgeri* e *Proteus morgani* formano colonie rosse, C 8 esterasi negative. *Salmonella paratyphi A* e *Salmonella cholerae-suis* formano colonie rosse, ma C 8 esterasi positive. *Salmonella arizonae* e *Salmonella* spp. formano colonie rosse con centro nero, C 8 esterasi positive.

2.1.5.3. Conferma biochimica

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie sospette al genere *Shigella* è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma: prova della C8 esterasi (opzionale), prova della presenza della citocromossidasi e della fermentazione dei carboidrati. 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 Agar nutritivo (2.1.4.3.) incubando a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.1.5.4. Prova della C8 esterasi

È una prova (opzionale) rapida di screening che differenzia *Shigella*, negativa, da *Salmonella*, positiva, direttamente sul terreno di primo isolamento.

Sottoporre al test le colonie cresciute su terreno di isolamento (2.1.4.2.) operando come di seguito specificato. Deporre una goccia di reattivo (2.1.4.6.) sulle colonie da saggiare; attendere 3-5 minuti e quindi osservare sotto la lampada di Wood a 366 nm. La mancata comparsa di fluorescenza è indice di risposta negativa che fa considerare presuntiva la presenza di *Shigella*. Le colonie trattate con il reattivo rimangono vitali; è opportuno, comunque, non esporre troppo a lungo le colonie alla luce ultravioletta onde evitare danni ai microrganismi che potrebbero essere resi non vitali, inficiando quindi le prove successive. Non effettuare la lettura oltre i 5 minuti e non saggiare colonie cresciute su Bismuth Sulphite Agar.

I valori di sensibilità del test sono quasi costantemente prossimi al 100%; i valori di specificità sono maggiormente variabili, ma comunque oscillanti tra l'80% e il 99,8%.

2.1.5.5. Prova della citocromossidasi

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Agar nutritivo (2.1.4.3.). 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'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. *Shigella* è ossidasi-negativa.

2.1.5.6. Prova della fermentazione dei carboidrati

Dall'Agar nutritivo (2.1.4.3.) prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento, sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro di Kliger (2.1.4.4.). Incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore. È essenziale che i risultati siano registrati dopo 18-24 ore di incubazione.

Shigella spp. non modifica la colorazione del terreno sulla superficie del becco di clarino e produce un viraggio del terreno al giallo (reazione acida) sul fondo.

2.1.5.7. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica.

È necessario segnalare che molti sierotipi di *Shigella* possono essere confusi con quelli di *Escherichia coli*. Pertanto prima di procedere alla conferma sierologica è necessario verificare con attenzione che le caratteristiche biochimiche siano tipiche del genere *Shigella*.

La tipizzazione può essere eseguita utilizzando sieri polivalenti e sieri monovalenti anti-O, oppure inviando gli stipti ai centri di riferimento. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

2.1.6. Espressione dei risultati

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

Riportare il risultato ottenuto come *Shigella* 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 *Shigella* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che possono comprendere: Arricchimento, Isolamento ed, eventualmente, Conferma biochimica e Conferma sierologica.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice 1).

2.2.3. Volume da analizzare

Il volume da analizzare, generalmente pari a 1 L, 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. Brodo GN Hajna

Composizione	
Triptoso	20 g
Glucosio	1 g
D-Mannitolo	2 g
Sodio citrato	5 g
Sodio desossicolato	0,5 g
Fosfato dipotassio	4 g

Fosfato monopotassio	1,5 g
Sodio cloruro	5 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±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 agitando frequentemente. Dopo avere sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare in autoclave a 121±3°C per 15 min. Conservare a 5±3°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.2.4.2. Salmonella Shigella Agar

Composizione	
Estratto di carne	5 g
Peptocomplex	5 g
Lattosio	10 g
Sali biliari n°3	8,5 g
Sodio citrato	8,5 g
Sodio tiosolfato	8,5 g
Citrato ferrico	1 g
Agar	13,5 g
Verde brillante	0,33 mg
Rosso neutro	25 mg
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±0,2	

Il terreno si trova 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. Non eccedere nel riscaldamento e non sterilizzare. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a 5±3°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Shigella flexneri* ATCC 12022 e come controllo negativo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

2.2.4.3. Agar nutritivo

Composizione	
Estratto di carne	3 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 6,8±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 in autoclave a 121±3°C per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a 5±3°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.2.4.4. Agar al ferro di Kliger

Composizione	
Estratto di carne	3 g
Estratto di lievito	3 g
Peptone	20 g
Sodio cloruro	5 g
Lattosio	10 g
Glucosio	1 g
Ferro citrato	0,3 g
Sodio tiosolfato	0,3 g
Rosso fenolo	50 mg
Agar	12 g
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 sterilizzare in autoclave a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 min. Lasciare solidificare su un piano inclinato per ottenere una superficie a becco di clarino.

Conservare a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Shigella flexneri* ATCC 12022 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.2.4.5. 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, a norma della direttiva del Consiglio 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

2.2.4.6. Reattivo MUCAP

Prodotto brevettato disponibile in commercio contenente un estere a otto atomi di carbonio coniugato con metilumbelliferone in solvente organico. Conservare il reattivo a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ in condizioni ottimali fino alla data di scadenza. Il prodotto è infiammabile; conservare e manipolare con le dovute precauzioni.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Fase di arricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo.

Rispettando le comuni norme di asepsi, filtrare almeno 1 L di campione su una membrana di 47 mm di diametro con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di $0,45\ \mu\text{m}$ (pori simmetrici da $0,45\ \mu\text{m}$ oppure pori asimmetrici da $0,7/0,2\ \mu\text{m}$). Se è necessario, per la presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL del brodo di arricchimento (2.2.4.1.) e incubare a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per un periodo compreso tra le 6 e le 24 ore.

2.2.5.2. Fase di isolamento

Dal brodo di arricchimento eseguire, prelevando un'ansata, preferibilmente, 2 subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento (2.2.4.2.): la prima dopo 6-12 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 18-24 ore. Incubare a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 20-24 ore.

Su *Salmonella Shigella* Agar le colonie sospette si presentano incolori, generalmente con margini netti, anche se spesso *Sh. sonnei* si presenta con margini irregolari. Le colonie rugose di *Shigella* sono inibite.

2.2.5.3. Conferma biochimica

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie sospette al genere *Shigella* è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma: prova della C8 esterasi (opzionale), prova della presenza della citocromossidasi e della fermentazione dei carboidrati. 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 Agar nutritivo (2.2.4.3.) incubando a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.2.5.4. Prova della C8 esterasi

È una prova (opzionale) rapida di screening che differenzia *Shigella*, negativa, da *Salmonella*, positiva, direttamente sul terreno di primo isolamento.

Sottoporre al test le colonie cresciute su terreno di isolamento (2.2.4.2.) operando come di seguito specificato. Deposare una goccia di reattivo (2.2.4.6.) sulle colonie da saggiare; attendere 3-5 minuti e quindi osservare sotto la lampada di Wood a 366 nm. La mancata comparsa di fluorescenza è indice di risposta negativa che fa considerare presuntiva la presenza di *Shigella*. Le colonie trattate con il reattivo rimangono vitali; è opportuno, comunque, non esporre troppo a lungo le colonie alla luce ultravioletta onde evitare danni ai microrganismi che potrebbero essere resi non vitali, inficiando quindi le prove successive. Non effettuare la lettura oltre i 5 minuti e non saggiare colonie cresciute su Bismuth Sulphite Agar.

I valori di sensibilità del test sono quasi costantemente prossimi al 100%; i valori di specificità sono maggiormente variabili, ma comunque oscillanti tra l'80% e il 99,8%.

2.2.5.5. Prova della citocromossidasi

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Agar nutritivo (2.2.4.3.). Strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.2.4.5.) 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. *Shigella* è ossidasi-negativa.

2.2.5.6. Prova della fermentazione dei carboidrati

Dall'Agar nutritivo (2.2.4.3.) prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento, sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro di Kligler (2.2.4.4.). Incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore. È essenziale che i risultati siano registrati dopo 18-24 ore di incubazione.

Shigella spp. non modifica la colorazione del terreno sulla superficie del becco di clarino e produce un viraggio del terreno al giallo (reazione acida) sul fondo.

2.2.5.7. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica.

È necessario segnalare che molti sierotipi di *Shigella* possono essere confusi con quelli di *Escherichia coli*. Pertanto prima di procedere alla conferma sierologica è necessario verificare con attenzione che le caratteristiche biochimiche siano tipiche del genere *Shigella*.

La tipizzazione può essere eseguita utilizzando sieri polivalenti e sieri monovalenti anti-O, oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai test specifici.

2.2.6. Espressione dei risultati

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

Riportare il risultato ottenuto come *Shigella* 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 *Shigella* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che possono comprendere: Arricchimento, Isolamento ed, eventualmente, Conferma biochimica e 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 1 L, 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. Brodo GN Hajna

Composizione	
Triptoso	20 g
Glucosio	1 g
D-Mannitolo	2 g
Sodio citrato	5 g
Sodio desossicolato	0,5 g
Fosfato dipotassio	4 g
Fosfato monopotassio	1,5 g
Sodio cloruro	5 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±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 agitando frequentemente. Dopo avere sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare in autoclave a 121±3°C per 15 min. Conservare a 5±3°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

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

2.3.4.2. 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±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±3°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento di *Shigella*, che garantiscono buoni risultati in fase analitica, questo substrato è comunque particolarmente adatto alla crescita di *Shigella*.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Shigella flexneri* ATCC 12022 e come controllo negativo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

2.3.4.3. Agar nutritivo

Composizione

Estratto di carne	3 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 6,8±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 in autoclave a 121±3°C per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a 5±3°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.3.4.4. Agar al ferro di Kliger

Composizione	
Estratto di carne	3 g
Estratto di lievito	3 g
Peptone	20 g
Sodio cloruro	5 g
Lattosio	10 g
Glucosio	1 g
Ferro citrato	0,3 g
Sodio tiosolfato	0,3 g
Rosso fenolo	50 mg
Agar	12 g
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 sterilizzare in autoclave a 121±3°C per 15 min. Lasciare solidificare su un piano inclinato per ottenere una superficie a becco di clarino.

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

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Shigella flexneri* ATCC 12022 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.3.4.5. 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, a norma della direttiva del Consiglio 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

2.3.4.6. Reattivo MUCAP

Prodotto brevettato disponibile in commercio contenente un estere a otto atomi di carbonio coniugato con metilumbelliferone in solvente organico. Conservare il reattivo a 5±3°C in condizioni ottimali fino alla data di scadenza. Il prodotto è infiammabile; conservare e manipolare con le dovute precauzioni.

2.3.5. Procedura

2.3.5.1. Fase di arricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo.

Rispettando le comuni norme di asepsi, filtrare almeno 1 L di campione su una membrana di 47 mm di diametro con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45 µm (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici da 0,7/0,2 µm). Se è necessario, per la presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL del brodo di arricchimento (2.3.4.1.) e incubare a 36±1°C per un periodo compreso tra le 6 e le 24 ore.

2.3.5.2. Fase di isolamento

Dal brodo di arricchimento eseguire, prelevando un'ansata, preferibilmente, 2 subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento (2.3.4.2.): la prima dopo 6-12 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 18-24 ore. Incubare a 36±1°C per 20-24 ore

Sul terreno Hektoen Enteric agar *Shigella* cresce con colonie verde chiaro senza viraggio del terreno, C 8 esterasi negative. 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 colonie di *Salmonella* si presentano di colore verde-blu o blu con o senza centro nero, C 8 esterasi positive. *Pseudomonas* cresce con colonie verdi o brunastre C 8 esterasi positive.

2.3.5.3. Conferma biochimica

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie sospette al genere *Shigella* è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma: prova della C8 esterasi (opzionale), prova della presenza della citocromossidasi e della fermentazione dei carboidrati. 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 Agar nutritivo (2.3.4.3.) incubando a 36±1°C per 18-24 ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.3.5.4. Prova della C8 esterasi

È una prova (opzionale) rapida di screening che differenzia *Shigella*, negativa, da *Salmonella*, positiva, direttamente sul terreno di primo isolamento.

Sottoporre al test le colonie cresciute su terreno di isolamento (2.3.4.2.) operando come di seguito specificato. Deposare una goccia di reattivo (2.3.4.6.) sulle colonie da saggiare; attendere 3-5 minuti e quindi osservare sotto la lampada di Wood a 366 nm. La mancata comparsa di fluorescenza è indice di risposta negativa che fa considerare presuntiva la presenza di *Shigella*. Le colonie trattate con il reattivo rimangono vitali; è opportuno, comunque, non esporre troppo a lungo le colonie alla luce ultravioletta onde evitare danni ai microrganismi che potrebbero essere resi non vitali, inficiando quindi le prove successive. Non effettuare la lettura oltre i 5 minuti e non saggiare colonie cresciute su Bismuth Sulphite Agar.

I valori di sensibilità del test sono quasi costantemente prossimi al 100%; i valori di specificità sono maggiormente variabili, ma comunque oscillanti tra l'80% e il 99,8%.

2.3.5.5. Prova della citocromossidasi

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Agar nutritivo (2.3.4.3.). 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'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. *Shigella* è ossidasi-negativa.

2.3.5.6. Prova della fermentazione dei carboidrati

Dall'Agar nutritivo (2.3.4.3.) prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento, sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro di Kligler (2.3.4.4.) Incubare a 36±1°C per 18-24 ore. È essenziale che i risultati siano registrati dopo 18-24 ore di incubazione.

Shigella spp. non modifica la colorazione del terreno sulla superficie del becco di clarino e produce un viraggio del terreno al giallo (reazione acida) sul fondo.

2.3.5.7. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica.

È necessario segnalare che molti sierotipi di *Shigella* possono essere confusi con quelli di *Escherichia coli*. Pertanto prima di procedere alla conferma sierologica è necessario verificare con attenzione che le caratteristiche biochimiche siano tipiche del genere *Shigella*.

La tipizzazione può essere eseguita utilizzando sieri polivalenti e sieri monovalenti anti-O, oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

2.3.6. Espressione dei risultati

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

Riportare il risultato ottenuto come *Shigella* 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.

Manafi M., R. Sommer. Comparison of three rapid screening methods for *Salmonella* spp.: MUCAP Test, MicroScreen Latex and Rambach Agar. *Letters in Applied Microbiology*, 14:163-169.

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).