

ASL N. 4 L'Aquila Ospedale San Salvatore	Procedura Operativa Standard	Rev 1.0
Dip. Patologia Clinica U.O. Medicina di Laboratorio	Esame colturale feci per la ricerca di Salmonella e Shigella (Coprocultura)	Ott. 2002
Settore Batteriologia tel 0862 368688		

1- Principio del Test

Inoculazione del campione di feci in mezzi di coltura definiti per l'isolamento dei patogeni del tratto gastrointestinale del genere *Salmonella* e *Shigella* .

2- Applicazione clinica

Le diaree infettive sono grandi problemi di salute pubblica in qualsiasi parte del mondo, principalmente nei paesi in via di sviluppo .Le diaree infettive continuano ad essere la maggiore causa di mortalità nel mondo attuale (con un numero stimato di 4 milioni di bambini morti ogni anno).Il genere *Salmonella* è responsabile, nell'uomo, di una serie di condizioni patologiche che vanno da forme leggere di gastroenterite fino a gravi febbri enteriche che possono avere esito letale; esistono inoltre portatori asintomatici.

3- Campione

RACCOLTA: campioni del tratto gastro intestinale devono essere coltivati per diagnosticare le gastroenteriti batteriche. Infezioni batteriche sono rare dato il pH dello stomaco estremamente acido; pertanto la maggior parte delle infezioni coinvolgono l'intestino. I sintomi clinici della gastroenterite includono nausea, vomito e diarrea. Nausea e vomito risultano usualmente dalla ingestione di tossine preformate .La storia clinica del paziente è particolarmente significativa per la determinazione del tipo di infezione. La qualità dell'acqua e degli alimenti ingeriti , viaggi in aree con scarse condizioni igienico sanitarie, l'uso recente di antibiotici e conoscenza di problemi simili in membri della famiglia sono punti importanti da considerare.I campioni di feci sono campioni piu' adeguati dei tamponi rettali. Un esame diretto delle feci alla ricerca dei PMN fecali , parassiti e lieviti deve essere realizzato prima. La presenza di molti leucociti è frequentemente una indicazione di infezione batterica.

I campioni vanno raccolti durante le prime fasi della infezione prima di iniziare il trattamento con antibiotici (quando sia il caso), quando la presenza dei patogeni nelle feci in numero elevato, è piu' probabile .I campioni vanno raccolti in recipienti sterili di misura adeguata , con coperchio a chiusura ermetica .All'arrivo al laboratorio le feci devono essere processate nel minore tempo possibile, non oltre le 2 ore dopo la raccolta. Nel caso non sia possibile , una quantità deve essere raccolta con un tampone, inserendolo con movimento rotatorio nelle feci. Questo deve essere inoculato in un mezzo di trasporto appropriato. Arrivato

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore:Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

al laboratorio , il campione va osservato per la consistenza (feci formate, liquide, ecc.), colore, componenti atipiche (sangue, muco, ecc.).

4- Standard, Controlli, Reagenti

Per la coprocultura di routine per *Salmonella* e *Shigella* si usano i seguenti mezzi:

- 1) terreni liquidi di arricchimento
- 2) terreni solidi di isolamento e selettivi

1) TERRENO DI ARRICCHIMENTO GN :

Usato per la coltivazione selettiva dei batteri intestinali Gram negativi (specialmente *Shigella*) a partire da ogni tipo di materiale. In questo mezzo di coltura, il rendimento della *Shigella* è migliore che non nella coltura diretta su piastra con mezzi selettivi (CROFT & MILLER, 1956). Secondo diversi autori (TAYLOR & SCHELHART, 1967; DUNN & MARTIN, 1971), il rendimento di *Salmonella* e *Shigella* è notevolmente migliorato, specialmente in combinazione agli Agar X.L.D. e S.S.

FORMULA: Il triptosio serve come base nutritiva .Il citrato e il deossicolato come agenti selettivi per inibire la crescita dei microorganismi Gram-positivi specialmente *Enterococcus faecalis*, ogni tipo di bacillo sporulante e certi coliformi. Il mannitolo favorisce la crescita di *Salmonella* e *Shigella* che lo utilizzano. Un tampone fosfato impedisce l'acidificazione precoce del mezzo dai prodotti metabolici acidi. *Pseudomonas* e *Proteus*, se presenti, si moltiplicano poco nelle prime 6-8 ore, più lentamente di *Salmonella* e *Shigella*.

IMPIEGO E INTERPRETAZIONE:

Seminare il brodo di arricchimento con il materiale .Incubare a temperatura ambiente o a 37°C per 6 ore. Dopo replicare nei mezzi solidi.

2)TERRENO DI ARRICCHIMENTO SELENITE F:

Selenite F broth è un terreno di arricchimento per i microrganismi del genere *Salmonella* nelle feci, urine, tessuti o altro materiale patologico. Il sodio selenite ha una notevole tossicità per *Escherichia coli* ma non per le salmonelle. (CROFT & MILLER, 1956). Secondo diversi autori (TAYLOR & SCHELHART, 1967; DUNN & MARTIN, 1971), il rendimento di *Salmonella* e *Shigella* è notevolmente migliorato, specialmente in combinazione agli Agar X.L.D. e S.S.

FORMULA: Il triptosio serve come base nutritiva. Il tampone tende a rendere minimi gli effetti alcalinizzanti indotti dalla riduzione del selenito; gli acidi prodotti dai coliformi a partire dal lattosio contribuiscono anch'essi a neutralizzare le reazioni alcaline del terreno. Si consiglia di trapiantare dopo 8-12 ore. Il terreno di arricchimento è consigliato per la ricerca dei portatori, pazienti convalescenti, mentre nel caso di salmonellosi acuta in atto va bene la semina direttamente su Agar SS. Questo terreno ha come limite un minore recupero delle Shigelle per

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

cui è raccomandato l'uso di un brodo meno selettivo quale il GN broth seguito dal trapianto in XLD agar.

IMPIEGO E INTERPRETAZIONE:

Seminare il brodo di arricchimento con il materiale fecale, almeno 1 gr di materiale. Se il campione è solido è opportuno emulsionarlo in soluzione fisiologica e inoculare 1 mL, per evitare che tali particelle solide interferiscano con le proprietà selettive del brodo selenite. Incubare a 37°C per 12-18 ore, seminare su piastre di Mc Conkey, XLD Agar SS Agar o Hektoen Agar o Deossicolato citrato Agar. Accertarsi che il brodo Selenite venga riportato a temperatura ambiente prima della inoculazione, inoculare un campione di feci della grandezza di un pisello o 0.5 mL di feci liquide in 3 mL di soluzione salina o di brodo Selenite, emulsionare agitando energicamente al vortex, lasciare riposare per qualche minuto per ridurre la formazione di aerosol. Inoculare il brodo in rapporto di 1 volume di emulsione per 10 volumi di brodo e incubare a 37°C per 18-24 ore. Non avvitare strettamente per permettere la circolazione di aria.

Il brodo di arricchimento GN è migliore del tetrationato, che è eccellente per la *Salmonella* ma non per la *Shigella* e migliore anche del selenito-cistina che è buono per l'arricchimento di *Salmonella* ma perde molto su *Shigella* che in genere sono presenti in piccolo numero nel campione. Il brodo va incubato per 6 ore in termostato e poi si replica questo mezzo in mezzi solidi quali Agar SS e Agar XLD

2) AGAR S.S. (*Salmonella/Shigella*):

Mezzo usato per l'isolamento di *Salmonella* e *Shigella* a partire dalle feci (principalmente), alimenti o altro materiale.

FORMULA: Il verde brillante, la bile e la elevata concentrazione di tiosolfato e citrato inibiscono considerevolmente la flora concomitante. Con il tiosolfato e gli ioni di ferro si possono osservare la formazione di idrogeno solforato, dall'annerimento delle colonie. I batteri lattosio (-) sono incolori mentre i batteri lattosio (+) virano il mezzo a rosa.

COMPOSIZIONE: vedi Manulae Biolife III edizione.

INTERPRETAZIONE: Colonie lattosio (-) sono incolori mentre le colonie lattosio (+) sono rosa. Le colonie che producono idrogeno solforato hanno un centro nero. Le salmonelle si presentano generalmente tonde con un piccolo centro nero, mentre il *Proteus* ha colonia irregolare con centro nero più grande.

COLONIE	MICRORGANISMI
Incolori, trasparenti	<i>Shigella</i> e alcune <i>Salmonella</i>
Trasparenti con centro nero	<i>Proteus spp.</i> e la maggior parte delle <i>Salmonella</i>
Rosa	<i>Escherichia coli</i>
Più grandi di E. Coli, rosa, opache, mucoidi	<i>Enterobacter spp.</i> / <i>Klebsiella spp.</i>

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

3) AGAR X.L.D. (Xilose-Lisina-Desossicolato):

Usato per l'isolamento e la differenziazione di enterobatteri patogeni, specialmente *Shigella* e *Salmonella*, secondo TAYLOR (1965). Con l'Agar X.L.D. si può rilevare un numero notevolmente maggiore di *Salmonella* e *Shigella* in confronto ad altri metodi di coltura selettiva (DUNN & MARTIN, 1971).

FORMULA: La formazione di acido da xilosi, lattosio e saccarosio producono un viraggio a giallo dell'indicatore di pH rosso del fenolo. Il tiosolfato il sale ferrico rilevano la formazione di H₂S per la precipitazione del solfato di ferro nero sopra le colonie. I batteri che decarbossilano la lisina, producendo cadaverina, sono riconosciuti per la presenza di una colorazione rosso-porpora, dovuta all'aumento del pH intorno alle colonie.

COMPOSIZIONE: vedi Manulæ Biolife III edizione.

IMPIEGO E INTERPRETAZIONE: Si seminano le feci sulla superficie direttamente o dopo diluizione (vedi sotto). Incubare 24 ore a 37°C.

COLONIE	MICRORGANISMI
Gialle, con zona gialla intorno, opache, con alone di precipitazione	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Aeromonas</i>
Gialle, con zona gialla intorno, opache, mucoidi, con alone di precipitazione	<i>Klebsiella</i>
Gialle, con zona gialla intorno, opache, a volte con centro nero	<i>Citrobacter</i> (ceppi lattosio positivi)
Gialle, con zona gialla intorno opache	<i>Serratia</i> , <i>Hafnia</i>
Gialle, con zona gialla, intorno, trasparenti, centro nero.	<i>Proteus vulgaris</i> e i maggiori ceppi di <i>Proteus mirabilis</i>
Dello stesso colore del mezzo di coltura, trasparenti, con centro nero	<i>Salmonella</i>
Dello stesso colore del mezzo di coltura, trasparenti	<i>Shigella</i> , <i>Providencia</i> , <i>Pseudomonas</i>
Arancio, leggermente opache	<i>Salmonella typhi</i> (ceppi xiloso-positivi)

5- Strumenti

Le identificazioni biochimiche dei microrganismi isolati, come la realizzazione degli antibiogrammi sono realizzati con sistema automatico AutoScan 4 (Dade Behring) nonché con il test al lattice colorato rapido per la identificazione e la rilevazione dei sierogruppi della *Salmonella* Wellcolex Colour *Salmonella*®

6- Procedimento Dettagliato

SEMINA DI ROUTINE: I campioni devono essere inoculati nel modo più rapido possibile in laboratorio. La inoculazione può essere fatta direttamente o dopo diluizione. La

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

diluizione dell'inoculo ha lo scopo di liberare i batteri dalla massa fecale e ridurre la flora competente, permettendo la migliore separazione delle colonie e la loro più facile identificazione. Se l'inoculazione diretta o previa diluizione non è immediata, si deve passare un tampone nel campione, raccogliendo materiale sufficiente e inoculandolo in un mezzo di trasporto adeguato, mantenuto a temperatura ambiente fino al momento della semina in mezzi solidi. L'apparenza dei campioni è registrata come "formata" o "liquida". Per feci formate, una porzione del materiale fecale grande come un pisello (circa 1 gr) è emulsionato in 3 ml di 0.1% acqua peptonata (Maximum Recovery Diluent della Oxoid). Per campioni liquidi, fare una diluizione 1:4 in MRD.

Semina diretta: Un tampone sterile di cotone è infilato nel materiale fecale e una porzione è inoculata in un terzo della superficie totale di ogni piastra. L'inoculo viene strisciato, con una ansa sterile, per ottenere eventuali colonie isolate.

Inoculo diluito: Una pipetta del tipo Pastette è usata per deporre due gocce di sospensione fecale in Agar selettivo.

Per la coltura microbica si devono usare mezzi a bassa selettività (per esempio Agar Mac Conkey, EMB Agar) e un altro mezzo con selettività moderata o alta (per esempio Agar SS, Hektoen Agar, o Agar X.L.D.), e altri, in accordo con la disponibilità del laboratorio e la necessità di isolamenti specifici, come nel caso di richiesta di *Vibrio*, *Campylobacter*, *Yersinia*.

IDENTIFICAZIONE DEI PATOGENI ENTERICI: Le colonie sospette devono essere identificate per conoscere con esattezza la specie che causa la infezione. Batteri dei generi *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia* devono essere sierotipizzati (con antisieri specifici anti-H, anti-O, polivalenti e monovalenti). Nel caso di *Escherichia coli* indagare le varianti enteropatogena, enteroinvasiva enterotossigena, enteroemorragica e enteroaggregante o enteroaderente, considerando sempre lo stato clinico del paziente e la età. Test sierologici definitivi prevedono l'uso di un elevato numero di antisieri rivolti verso gli antigeni somatici "O" e ciliari "H" e vengono eseguiti in centri di riferimento che per l'Abruzzo è L'Istituto Zooprofilattico di Teramo. Il test di cui si parla sotto serve ad identificare l'isolato a livello di sierogruppo "O".

WELLCOLEX COLOUR SALMONELLA®

Test al lattice colorato rapido per la rilevazione e la identificazione presuntiva dei sierogruppi della *Salmonella*.

Si tratta di una semplice e rapida procedura analitica qualitativa al lattice per lo screening, la rilevazione e la identificazione presuntiva del sierogruppo della *Salmonella* da brodo Selenite F e da altri mezzi solidi.

I due reagenti con cui si cimentano le colonie sospette o anche la brodocoltura di Selenite F ha un colore marrone. Si tratta di una miscela di sospensioni di particelle di lattice rosse, blu e verdi. Quindi poiché i 6 anticorpi a cui sono legati i 6 lattici di diverso colore agiscono contro uno specifico antigene, uno dei colori della miscela si agglutinerà e la identità dell'antigene si manifesterà tramite il colore delle particelle aggregate con un cambiamento altresì del colore di

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

fondo. Il risultato negativo vede la sospensione grigio-marrone rimanere omogenea o aversi una reazione aspecifica nel quale tutte le particelle si agglutinano in aggregati di colore marrone contro un fondo chiaro.

Reagente al lattice 1

Le particella al lattice sono rivestite di anticorpi di coniglio con la seguente specificità:

Lattice **rosso** *Salmonella* di gruppo B

Lattice **blu** *Salmonella* di gruppo C

Lattice **verde** *Salmonella* di gruppo D1

Reagente al lattice 2

Le particella al lattice sono rivestite di anticorpi di coniglio con la seguente specificità:

Lattice **rosso** Vi

Lattice **blu** *Salmonella* dei gruppi E e G

Lattice **verde** *Salmonella* di gruppo A

Controlli positivi rosso/blu/verde

Il test puo' essere eseguito su colonie non fermentanti il lattosio che crescono in coltura primaria su terreni selettivi (Agar Mac Conkey, Agar enterico Hektoen, Agar XLD), direttamente su brodo selenite dopo almeno 18 ore di incubazione. E' possibile altresì utilizzare la sospensione per le prove di agglutinazione con il kit Wellcolex Colour *Shigella* ®

Identificazione delle colonie:

- 1) dispensare circa 200 µL di soluzione salina in una provetta di sospensione .Il dispensatore del campione monouso è graduato a circa 200 µL;
- 2) da una coltura incubata *overnight* , raccogliere una o due colonie di dimensioni medie sospettate di contenere *Salmonella* dalla piastra di coltura , utilizzando la estremità piatta del bastoncino di campionamento e emulsionare con attenzione i batteri nella soluzione salina;
- 3) risospendere i reagenti al lattice 1 e 2 agitandoli per alcuni secondi, far cadere una goccia di ciascun lattice dentro il cerchio distinto del cartoncino di reazione ;
- 4) trasferire una goccia di sospensione batterica (40 µL) con il dispensatore monouso in ciascuno dei due cerchi. Prestare attenzione a non dispensare aria;
- 5) miscelare il contenuto di ogni cerchio con un bastoncino e spandere fino a coprire l'intera area;
- 6) posizionare il cartoncino in un apposito agitatore rotante su una superficie piana ed agitare a 150 +- 5 rpm per 2 minuti .Spegnere l'agitatore ed osservare la agglutinazione senza rimuovere il cartoncino dell'agitatore ;

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Risultato negativo:

Nessuno dei due reagenti al lattice si agglutina e l'aspetto omogeneo colore marrone rimane sostanzialmente invariato nel corso del test.

Risultato positivo: si agglutina una delle sospensioni al lattice colorate della miscela che causa altresì un cambiamento del colore di fondo. Solitamente si agglutina un unico colore in un reagente al lattice, tuttavia con una coltura mista di *Salmonella*, due colori possono agglutinarsi in un reagente al lattice o un unico colore in entrambi i reagenti.

Fare riferimento alle figure allegate.

Un risultato positivo indica la presenza ed identifica altresì il sierogruppo di *Salmonella* (o la presenza dell'antigene Vi) nel campione nel modo seguente:

Reazione	Fondo	Reagente 1	Reagente 2
Verde, Verde oliva	Porpora/rosa	Sierogruppo D	Sierogruppo A
Blu	Arancione/rosa	Sierogruppo C	Sierogruppo E o G
Rossa	Blu/turchese	Sierogruppo B	Vi
Rosso scuro/marrone	Grigio/marrone uniforme	Negativo	Negativo
Nessuna agglutinazione	Grigio/marrone uniforme	Negativo	Negativo
Agglutinazione fine, granulare rosso scuro/marrone in entrambi i reagenti	Grigio/marrone chiaro	Non specifico	Non specifico
Turchese	Rosa	C e D	A e E o G
Arancione	Blu	B e D	A e Vi
Porpora	Verde	B e C	E o G e Vi

Se si individua l'antigene Vi (agglutinazione rossa con il reagente al lattice 2) prelevare un campione fresco di brodo selenite o preparare una nuova sospensione della coltura in soluzione salina contenente formalina alla concentrazione finale dello 0.5% in una apposita provetta per uccidere i batteri. Immergere la provetta in bagnomaria bollente per 5 minuti, fare raffreddare e rianalizzare con un reagente al lattice 1. L'ebollizione eliminerà l'antigene Vi. L'agglutinazione evidenzierà il sierogruppo di *Salmonella*; se non si verifica alcuna agglutinazione con il reagente al lattice 1, la coltura non contiene *Salmonella*. L'antigene Vi continuerà a reagire con il reagente al lattice 2 anche dopo la ebollizione. Se si ottiene una reazione non specifica, il risultato non è interpretabile e per la identificazione devono essere eseguite delle procedure convenzionali.

Per la identificazione definitiva sono necessarie le procedure biochimiche usuali.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

Si possono riscontrare reazioni false positive a causa della presenza di antigeni comuni in specie o generi eterologhi, quali il *Citrobacter*, che possono essere differenziati tramite procedure biochimiche convenzionali. L'antigene Vi può essere riscontrato in batteri diversi del genere *Salmonella*.

OSSERVAZIONI GENERALI: Nel caso il campione contenga muco, sangue, pus o altro materiale atipico, si deve fare un esame batterioscopico colorato per il metodo di Gram di questo materiale, indipendentemente dalla richiesta medica. Nella batterioscopia osservare la presenza/assenza dei batteri Gram negativi (in relazione alla flora anaerobica normale), cocci Gram positivi, lieviti e polimorfo nucleati (rari, moderata presenza, accentuata presenza, ecc.).

7- Calcoli

Non applicato

8- Controllo di qualità interno

Settimanalmente sono inoculati campioni batterici con profili fenotipici conosciuti per verificare la efficacia dei mezzi di coltura utilizzati.

9- Valori di riferimento, interpretazione, valori critici

Valore di riferimento: assenza di crescita dei microrganismi patogeni. Non sviluppo di *Salmonella* e *Shigella* spp.

10- Linearità e limite di rilevamento

Non applicato

11- Limitazioni del metodo

Paziente in terapia con antibiotici, raccolta inadatta, uso di mezzi di coltura disidratati o scaduti, temperatura di incubazione differente da 35-37°C.

12- Riferimenti bibliografici

1. Bertomeu A, Ros E, Barragan V, et al: Chronic diarrhea with normal stool and colonic examinations: organic or functional. *J Clin Gastroenterol* 13:531, 1991.
2. Bytzer P, Stockholm M, Andersen I, et al: Aetiology, medical history, and faecal weight in adult patients referred for diarrhoea: a prospective survey. *Scand J Gastroenterol* 25:572, 1990.
3. Donowitz M, Kokke FT, Saidi R: Evaluation of patients with chronic diarrhea. *N Engl J Med* 332:725, 1995.

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.

4. DuPont HL, and The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology: Guidelines on acute infectious diarrhea in adults. *Am J Gastroenterol* 92:1962, 1997.
5. Feldman R, Banatvala N: The frequency of culturing stools from adults with diarrhoea in Great Britain. *Epidemiol Infect* 113:41, 1994.
6. Nye K.J. , Turner , D.J. , Coleman D., Fallon B., Gee S., Messer R., Warren R.E. and Andrews N. :A Comparison of thre isolation rates of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* species after direct inoculation of media with a dilute faecal suspension and undiluted faecal material. *J. Med. Microbiol . Vol (50) , 659-662 (2001)*

Elaborazione	Verifica		Approvazione
Settore: Batteriologia Nome: Gianfranco Bruno Firma	Sezione: Nome: Firma.	Sezione: Nome: Firma.	Dirigente II liv.: Nome: Firma.