

## 7090. *Vibrio spp*

### 1. Introduzione

I microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* sono ampiamente distribuiti nell'ambiente acquatico. A differenza della maggior parte dei patogeni enterici che vengono veicolati nell'ambiente idrico attraverso gli scarichi, i microrganismi compresi in questo genere sono stati isolati, oltre che da acque reflue e acque estuariali, anche da acque dolci superficiali non contaminate da scarichi fecali.

*Vibrio cholerae* è la specie più importante del gruppo che fa parte della famiglia delle *Vibrionaceae*. Al genere appartengono microrganismi motili, bastoncelli gram-negativi, asporigeni e anaerobi facoltativi. Diverse sono le specie, alcune delle quali alofile. Di *V. cholerae* sono stati individuati più di 130 sierogruppi e prima del 1992 solo il sierogruppo O1 era stato associato a epidemie e casi di colera. Dal 1993 tuttavia il sierogruppo O139 (non-O1) è ritenuto responsabile delle epidemie registrate nei Paesi dell'area orientale. I biotipi non-O1, ampiamente diffusi nell'ambiente acquatico, possono essere responsabili di sindromi simili al colera e causa di epidemie circoscritte e le manifestazioni cliniche, in generale, possono essere riconducibili a infezioni localizzate dei tessuti molli e delle mucose, infezioni sistemiche e gastroenteriti acute.

La clorazione delle acque è tuttora considerata una efficace misura di prevenzione per il controllo del colera. Tuttavia è stato osservato che fenotipi rugosi sono in grado di sopravvivere in presenza di 2 mg/L di cloro residuo libero con un tempo di contatto di 30 minuti.

#### 1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la presenza o l'assenza di microrganismi appartenenti al genere *Vibrio*.

#### 1.3 Principio del metodo

Il metodo proposto consente di valutare la Presenza/Assenza di *Vibrio* 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.

#### 1.4 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

### 2. Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare un volume minimo pari a 10 mL, mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

### 3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

### 4. Reattivi e terreni di coltura

#### 4.1 Brodo di arricchimento

##### 4.1.1 Acqua Peptonata Alcalina

*Composizione:*

Peptone	10	g
Sodio cloruro	10	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 8,5±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, ma evitando il surriscaldamento. Agitare frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Raffreddare e modificare il pH con l'aggiunta di un'aliquota di NaOH 0,1 N. Distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C per non più di quattro settimane in condizioni ottimali.

##### 4.1.2 Soluzione di idrossido di sodio 0,1 N

*Composizione:*

Idrossido di sodio	4	g
Acqua distillata	1000	mL

Agitare vigorosamente con barretta magnetica fino a completa dissoluzione.

#### 4.2 Substrato di isolamento

##### 4.2.1 Agar al Tiosolfato Citrato Bile e Saccarosio

*Composizione:*

Estratto di lievito	5	g
Peptone	10	g
Sodio tiosolfato	10	g
Sodio citrato	10	g
Sali di bile	8	g
Saccarosio	20	g
Sodio cloruro	10	g
Citrato ferrico	1	g
Agar	14	g
Blu di bromotimolo	40	mg
Blu timolo	40	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 8,6±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, ma evitando il surriscaldamento. Agitare frequentemente per ottenere la completa soluzione

degli ingredienti, raffreddare. Se necessario modificare il pH con l'aggiunta di un'aliquota di NaOH 0,1 N (4.1.2). Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di quattro settimane in condizioni ottimali.

È stato osservato che la selettività dei diversi terreni TCBS presenti sul mercato può essere diversa: ciò può portare a risultati diversi nella crescita del microrganismo ricercato. Con prove di controllo di qualità verificare le rese quali-quantitative dei substrati.

### 4.3 Substrati di crescita

#### 4.3.1 Triptone Soia Agar con NaCl all'1%

<i>Composizione:</i>		
Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	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 per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Aggiungere 1 mL di una soluzione di NaCl per ogni 100 mL di terreno preparato. Sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

#### 4.3.2 Brodo al Triptone di Soia con NaCl all'1%

<i>Composizione:</i>		
Digerito pancreatico di caseina	17	g
Digerito papainico di farina di soia	3	g
Sodio cloruro	5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,5	g
Destrosio	2,5	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 e agitare frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Aggiungere 1 mL di una soluzione di NaCl per ogni 100 mL di terreno preparato. Distribuire in tubi aliquote di circa 10 mL. Sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C per non più di un mese.

### 4.4 Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

#### 4.4.1 Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

<i>Composizione:</i>		
N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina 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.

**Nota:** la *N,N,N',N'*-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato è classificato come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.

#### 4.5 Vibriostatico

In commercio esistono dischetti da 10 µg e da 150 µg di vibriostatico 0/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina fosfato).

### 5. Procedura

#### 5.1 Fase di Arricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo. Filtrare un volume 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 è necessario per presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua Peptonata Alcalina (4.1.1). Incubare a 36±1°C per 6-8 ore, fino a un massimo di 18 ore.

#### 5.2 Fase di Isolamento ed identificazione delle colonie

Dal brodo di arricchimento (4.1.1) prelevare un'ansata dalla pellicola formata sulla superficie del brodo ed effettuare uno striscio sul terreno di isolamento (4.2.1). Incubare a 36±1°C per 18-20 ore. È consigliabile contemporaneamente prelevare 10 mL di brodocoltura dal brodo di arricchimento (4.1.1) e inoculare in un'altra beuta contenente 100 mL di Acqua Peptonata Alcalina (4.1.1). Incubare a 36±1°C per 6-8 ore, fino a un massimo di 18 ore. Dopo incubazione prelevare un'ansata dalla pellicola formata sulla superficie del brodo ed effettuare uno striscio su un'altra piastra Petri contenente il terreno di isolamento (4.2.1). Incubare a 36±1°C per 18-20 ore.

I microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* sviluppano sul substrato di isolamento (4.2.1) colonie gialle con centro opaco e margini traslucidi, piatte, con diametro di 2-4 mm e colonie verdi, piatte, con diametro di 1-3 mm.

### 6. Conferma biochimica

Per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Vibrio* delle colonie sospette procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma: colorazione di Gram, prova della citocromossidasi (6.2), prova della suscettibilità al vibriostatico (6.3).

Successivamente l'identificazione biochimica può essere completata con i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio.

Prima di effettuare ciascuna prova si suggerisce, onde verificarne la purezza, di subcoltivare le colonie sospette su Triptone Soia Agar con NaCl all'1% (4.3.1) e incubare a 36±1°C per 24±2 ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

#### 6.1 Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. *Vibrio* spp è ossidasi-positivo ad eccezione di *V. metschnikovii* che è ossidasi negativo.

Dal terreno Triptone Soia Agar con NaCl all'1% (4.3.1) prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, la colonia cresciuta e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (4.4.1) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. Una reazione positiva si evidenzia quando si produce, entro 10 secondi, una colorazione blu-violetto.

## 6.2 Prova della suscettibilità al vibriostatico

La prova può permettere di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* da quelli appartenenti al genere *Aeromonas*. *Vibrio* spp è in genere suscettibile al vibriostatico. Dal terreno Triptone Soia Agar con NaCl all'1% (4.3.1) prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, la colonia da saggiare e inoculare in Brodo al Triptone di Soia con NaCl all'1% (4.3.2). Incubare a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  per 18-24 ore. La crescita è evidenziata dalla torbidità del terreno. Imbibire un tampone sterile nella brodocoltura e strisciare abbondantemente sul terreno Triptone Soia Agar con NaCl all'1% (4.3.1). Sulla superficie dell'Agar applicare, ad adeguata distanza, un dischetto da 10 µg e uno da 150 µg di vibriostatico O/129 (4.5). Incubare a  $36\pm 1^\circ\text{C}$  per 18-24 ore.

Dopo incubazione verificare l'eventuale presenza o assenza di aloni di inibizione intorno ai dischetti. *Vibrio* spp è generalmente sensibile al vibriostatico, mentre *Aeromonas* è resistente. Recentemente sono stati riportati casi in cui biotipi di *V. cholerae* sono risultati resistenti al vibriostatico (es.: *V. cholerae* O139).

## 7. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Vibrio* possono essere tipizzati utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento per la tipizzazione di *Vibrio*.

Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

## 8. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come *Vibrio*: Assente o Presente in 1 L e, se del caso, il sierogruppo individuato.

## 9. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come presenza/assenza di *Vibrio* per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

## BIBLIOGRAFIA

KAY B.A., BOPP C.A. & WELLS J.G. (1994): "Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens". In: *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*. I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik (Ed.) Washington D.C.: American Society for Microbiology.

KAYSNER C.A. & HILL W.E. (1994): "Toxigen *Vibrio cholerae* O1 in food and water". In *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*. I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik (Ed.) Washington D.C.: American Society for Microbiology.