



SHIGELLA BROTH BASE NOVOBIOCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT

Terreno di coltura in polvere e supplemento selettivo

1 – DESTINAZIONE D'USO

Con l'aggiunta di novobiocina, Shigella Broth Base è utilizzato come brodo di arricchimento selettivo per la determinazione (presenza o assenza) di *Shigella* in campioni della catena alimentare secondo le norme ISO 21567 e FDA-BAM.

2 – COMPOSIZIONE

SHIGELLA BROTH BASE, TERRENO DISIDRATATO

FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO DISCIOGLIMENTO IN ACQUA *

Digerito enzimatico di caseina	20,00 g
Potassio idrogeno fosfato (anidro)	2,00 g
Potassio diidrogeno fosfato (anidro)	2,00 g
Sodio cloruro	5,00 g
Glucosio	1,00 g
Tween 80	1,50 g

*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

NOVOBIOCIN ANTIMICROBIC SUPPLEMENT – CONTENUTO DEL FLACONE

Novobiocina	10 mg
-------------	-------

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Le specie di *Shigella* sono bastoncini Gram-negativi, non mobili, anaerobi facoltativi, non sporigeni, appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, strettamente imparentati con *E. coli*. Il genere prende il nome dalla sua scoperta da parte di Kiyoshi Shiga nel 1897. L'attuale classificazione divide il genere in quattro specie sulla base della tipizzazione sierologica: *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. flexneri* e *S. sonnei*. La loro azione patogena è dovuta alla spiccata invasività nei confronti dell'epitelio intestinale dell'ileo e del colon e alla produzione di endotossine ed esotossine.² Ogni anno, nel mondo, si registrano circa 80-165 milioni di casi di malattie da *Shigella*, che causano da 74.000 a 600.000 casi di morte, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo.³

Shigella Broth si basa sulla formula sviluppata da Mehlman, Romero e Wentz⁴ ed è raccomandato da ISO 21567⁵ e FDA-BAM⁶ come brodo di arricchimento selettivo per la determinazione di *Shigella* in campioni della catena alimentare.

I fattori di crescita essenziali sono forniti dal digerito enzimatico di caseina, fonte di azoto, carbonio e minerali. Il glucosio è una fonte di carbonio ed energia; il cloruro di sodio è una fonte di elettroliti e mantiene l'equilibrio osmotico. I fosfati sono utilizzati come agenti tampone per controllare il pH del terreno di coltura. Il polisorbato 80 neutralizza i conservanti nei prodotti alimentari, permettendo ai batteri di crescere. La novobiocina è attiva soprattutto contro i batteri Gram-positivi, ma anche contro alcuni Gram-negativi. La sua concentrazione nel terreno di coltura raccomandato dalla norma ISO 21567⁵ è di 0,5 mg/L con incubazione anaerobica a 41,5°C, mentre la FDA-BAM⁶ raccomanda 0,5 mg/L per la rilevazione di *S. sonnei* con incubazione anaerobica a 44°C, e 3 mg/L per l'arricchimento di altre specie di *Shigella*, con incubazione anaerobica a 42°C.

4 – PREPARAZIONE

Sospendere 31,5 g in 1000 mL di acqua fredda e purificata. Mescolare accuratamente e riscaldare leggermente, se necessario, per sciogliere completamente la polvere. Distribuire 225 mL in bottiglie e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a temperatura ambiente.

Sciogliere il contenuto di una fiala di Novobiocin Antimicrobic Supplement (REF 4240045) con 4 mL di acqua depurata sterile (concentrazione di novobiocin: 2,5 mg/mL). Aggiungere un volume di soluzione di novobiocina al terreno di coltura per ottenere la concentrazione di antibiotico richiesta:

Shigella Broth secondo ISO 21567 e FDA-BAM per *S. sonnei*: aggiungere 50 µL di soluzione a 225 mL di Shigella Broth Base (concentrazione finale di 0,5 µg/mL di brodo dopo l'aggiunta di 25 g o 25 mL di campione).

Shigella Broth secondo FDA-BAM per altre specie di *Shigella*: aggiungere 300 µL di soluzione a 225 mL di Shigella Broth Base (concentrazione finale 3 µg/mL di brodo dopo l'aggiunta di 25 g o 25 mL di campione).

La soluzione di novobiocina rimanente può essere conservata a 2-8°C per un mese.⁵

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere

Fine granulometria omogenea, grigia

Aspetto del terreno in flacone

giallo, leggermente opalescente

Aspetto del supplemento liofilizzato

compressa bassa e compatta di colore bianco, soluzione incolore e limpida dopo la ricostituzione.

pH (20-25 °C)

7,0 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Shigella Broth Base	Terreno in polvere	4020402	500 g (15,8 L)
Novobiocin Antimicrobic Supplement	Supplemento liofilo	4240045	10 flaconi, 10 mg/flacone

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse, tamponi e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, provette o flaconi sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.



8 – CAMPIONI

Prodotti destinati al consumo umano, all'alimentazione degli animali e campioni ambientali nel settore della produzione e della manipolazione degli alimenti. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole di buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard internazionali applicabili.^{5,6}

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Arricchimento della specie *Shigella* secondo la norma ISO 21567⁵ (o *S. sonnei* secondo la norma FDA-BAM⁶)

Il seguente metodo è una sintesi della tecnica raccomandata da

1. In generale, per preparare la sospensione iniziale, aggiungere una porzione di prova di 25 g o 25 mL a 225 g o 225 mL di Shigella Broth contenente 0,5 µg/mL di novobiocina, per ottenere una diluizione decuplicata, e omogeneizzare.
2. Incubare in condizioni anaerobiche con tappi e chiusure allentate, o con attrezzature che diano un effetto equivalente, in modo che lo scambio di gas possa avvenire facilmente senza contaminazione, a 41,5 ± 1 °C (44 °C: FDA-BAM).
3. Trasferire un'aliquota di crescita su piastre di Mac Conkey Agar REF 401670 (bassa selettività), XLD Agar ISO Formulation REF 402208 (selettività moderata) e Hektoen Enteric Agar REF 401541 (massima selettività). FDA-BAM: striscia su piastra Mac Conkey Agar.
4. Incubare i terreni di coltura a 37 °C per 20-24 ore. Se non si osservano colonie tipiche e la crescita di altri microrganismi è debole (in particolare sull'agar più selettivo), reincubare le piastre per altre 24 ore. Esaminare nuovamente le colonie tipiche di *Shigella*.

Arricchimento di altre specie di *Shigella* secondo FDA-BAM.⁶

Procedere come sopra, ma utilizzare novobiocina a 3,0 µg/mL e incubare in anaerobiosi a 42°C.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione di Shigella Broth, la crescita è evidente dalla comparsa di torbidità.

Dopo la subcoltura sul terreno di coltura e l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie. Consultare le norme ISO 21567⁵, FDA-BAM⁶ e le istruzioni per l'uso dei terreni di coltura per una descrizione delle colonie di *Shigella* sui diversi agar selettivi utilizzati.

Eseguire i test di conferma biochimica e sierologica sulle colonie tipiche o sospette come riportato negli standard internazionali.^{5,6}

11 – CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi utili per il controllo qualità.³

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>Shigella boydii</i> ATCC 9207	41,5°C ± 1°C / 18h ± 2h / AN	Buona crescita
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	41,5°C ± 1°C / 18h ± 2h / AN	Buona crescita
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 9290	41,5°C ± 1°C / 18h ± 2h / AN	Buona crescita
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 9721	41,5°C ± 1°C / 18h ± 2h / AN	Buona crescita
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	41,5°C ± 1°C / 18h ± 2h / AN	Inibito

AN: incubazione anaerobica; ATCC è un marchio di American Type Culture Collection.

12- CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Shigella Broth Base disidratato integrato con 0,5 µg/mL di novobiocina (REF 4240045) viene testato per la produttività e la selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con il metodo della diluizione fino all'estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni decimali appropriate di organismi bersaglio in provette, incubando a 41,5°C per 24 ore in condizioni anaerobiche e registrando la diluizione più alta che mostra crescita nel lotto di riferimento (Gr_{RB}) e nel lotto di prova (Gr_{TB}). La produttività viene testata con i seguenti ceppi target: *S. boydii* ATCC 9207, *S. flexneri* ATCC 12022, *S. sonnei* ATCC 9290. L'indice di produttività Gr_{RB}-Gr_{TB} per ciascun ceppo in esame deve essere ≤ 1.

La selettività viene testata con il metodo delle diluizioni a estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni decimali appropriate del ceppo non target: *S. aureus* ATCC 25923. Dopo l'incubazione il ceppo di *S. aureus* risulta inibito.

13 – LIMITI DEL METODO

- Le specie di *Shigella* possono costituire una percentuale minoritaria della flora microbica totale quando contaminano un campione di cibo o dopo l'arricchimento. In queste circostanze, lo stripping diretto del brodo di arricchimento su una piastra per agar selettivo può non consentire l'individuazione delle colonie di *Shigella*. Pertanto, in alcune circostanze (ad esempio, l'indagine su alimenti implicati in malattie) può essere opportuno prendere in considerazione l'inoculazione di due piastre da 90 mm o di una piastra Petri grande (140 mm) per aumentare la possibilità di rilevamento⁵.
- Le colonie di alcuni ceppi di *Enterobacteriaceae* hanno un aspetto molto simile a quelle di *Shigella*. Tutte le colonie tipiche o sospette devono essere confermate come specie di *Shigella* o meno. Inoltre, in alcune circostanze (ad esempio, alimenti implicati in intossicazioni alimentari), può essere opportuno esaminare più di cinque colonie da una piastra per aumentare la fiducia nell'assenza di *Shigella* nel campione alimentare analizzato.⁵

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di base e il supplemento qui descritti sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura ed i supplementi devono essere utilizzati in associazione secondo le indicazioni descritte. Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni.
- I terreni disidratati ed i supplementi contenenti antibiotici devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Novobiocin Antimicrobial Supplement è classificato come pericoloso secondo la normativa vigente. Prima dell'uso, consultare le schede di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web



www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.

- Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- I supplementi sono sterilizzati mediante filtrazione su membrana.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura in polvere, i supplementi ed i ceppi microbici..
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego dei prodotti, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Terreno di coltura in polvere

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

Supplemento liofilizzato











Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Una volta aperto il flacone e ricostituito il liofilizzato, la soluzione ottenuta deve essere usata immediatamente. Prima dell'uso esaminare il liofilizzato e il prodotto ricostituito per rilevare segni evidenti di deterioramento (es. contaminazione, colore alterato o altra caratteristica anomala).

L'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo la norma ISO 21567, Shigella Broth Base preparato in fiaschette e la soluzione di novobiocina rimanente possono essere conservati a 2-8°C per un massimo di 1 mese.⁵

16- BIBLIOGRAFIA

1. Bakera S, Chung H. Thea Recent insights into Shigella: a major contributor to the global diarrhoeal disease burden. *Curr Opin Infect Dis.* 2018 Oct; 31(5): 449–454.
2. Ryan, Kenneth James; Ray, C. George, eds. (2004). *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases* (4th ed.). McGraw-Hill Professional Med/Tech.
3. Bowen A. Chapter 3: "Infectious Diseases Related to Travel". *The Yellow Book: Health Information for International Travel*. Retrieved 22 June 2016.
4. Mehlman IJ, Romero A, Wentz BA. Improved enrichment for recovery of Shigella sonnei from foods. *J Assoc Off Anal Chem* 1985 May-Jun; 68(3): 552-5.
5. ISO 21567:2004 Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of Shigella spp.
6. U.S. Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 6: Shigella*. Rev. February 2013.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	o REF Numero di lotto	 Fabbricante	 Utilizzare entro	 Proteggere dall'umidità	 Fragile, maneggiare con cura
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Lato superiore	 Proteggere dalla luce	

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del layout	04/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni

