

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Metodi analitici di riferimento
per le acque destinate al consumo umano
ai sensi del DL.vo 31/2001.
Metodi microbiologici**

A cura di
Lucia Bonadonna e Massimo Ottaviani
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
07/5

Istituto Superiore di Sanità

Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici.

A cura di Lucia Bonadonna e Massimo Ottaviani

2007, iv, 204 p. Rapporti ISTISAN 07/5

Il volume raccoglie i metodi analitici di riferimento per la determinazione dei parametri microbiologici nelle acque destinate al consumo umano ai sensi del Decreto Legislativo 31/2001 (recepimento della Direttiva Europea 98/83/EC) e successive modifiche e integrazioni e secondo quanto previsto al punto 5.4 della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025. Il rapporto è affiancato da un'analogia pubblicazione relativa ai metodi chimici, prodotta all'interno della stessa serie. I metodi sono stati elaborati dalla Sottocommissione del Comitato permanente di Studio sulle Acque (ex art. 9 del DM 26 marzo 1991) del Ministero della Salute ed emanati dal Reparto Igiene delle Acque Interne del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità.

Parole chiave: Acque destinate al consumo umano, Metodi microbiologici

Istituto Superiore di Sanità

Reference analytical methods for water intended for human consumption according to the Italian Legislative Decree 31/2001. Microbiological methods.

Edited by Lucia Bonadonna and Massimo Ottaviani

2007, iv, 204 p. Rapporti ISTISAN 07/5 (in Italian)

The volume gathers reference analytical methods for the detection of microbiological parameters in waters intended for human consumption according to the Legislative Decree 31/2001 and its integrations and in accordance with the point 5.4 of the UNI CEI EN ISO/IEC 17025. The report is associated with the volume of the chemical methods, printed in the same book series. The methods are elaborated by the Subcommittee of the Permanent Study Committee (ex article 9 of the Italian Ministerial Decree of March 26, 1991), established at the Ministry of Health, and are issued by the Section of Inland Water Hygiene of the Department of Environment and Primary Prevention of the Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy).

Key words: Microbiological analytical methods, Water intended for human consumption

Per informazioni su questo documento rivolgersi a: lucia.bonadonna@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Bonadonna L, Ottaviani M (Ed.). *Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/5).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2007

COMITATO PERMANENTE DI STUDIO (ex art. 9, DM 26 marzo 1991)
II SOTTOCOMMISSIONE DI STUDIO “METODI ANALITICI”
Coordinatore generale: M. Ottaviani, Istituto Superiore di Sanità

Gruppo di lavoro “Metodi microbiologici e biologici”

Coordinatore: L. Bonadonna, Istituto Superiore di Sanità

Alava F.	<i>BAS-SII, Bergamo</i>
Berchielli S.	<i>Publiacqua SpA, Firenze</i>
Bonanni E.	<i>LaboratoRI SpA (Gruppo ACEA)</i>
Bonetta S.	<i>Università del Piemonte Orientale, Alessandria</i>
Briancesco R.	<i>Istituto Superiore di Sanità, Roma</i>
Burrini D.	<i>Publiacqua SpA, Firenze</i>
Cangini M.	<i>Centro Ricerche Marine S conspA, Cesenatico</i>
Carraro E.	<i>Università del Piemonte Orientale, Alessandria</i>
Cataldo C.	<i>Istituto Superiore di Sanità, Roma</i>
de Lellis L.	<i>HERA SpA, Ravenna</i>
Della Libera S.	<i>Istituto Superiore di Sanità, Roma</i>
Divizia M.	<i>Università di Tor Vergata, Roma</i>
Donia D.	<i>Università di Tor Vergata, Roma</i>
Ferrara L.	<i>ARPA Piemonte, Novara</i>
Ferrari G.	<i>ASL di Vallecamonica-Sebino, Darfo Boario Terme</i>
Fronticelli Baldelli A.	<i>HERA SpA, Ravenna</i>
Garizio M.	<i>Società Metropolitana Acque Torino SpA, Torino</i>
Graziani G.	<i>Romagna Acque - Società delle Fonti SpA, Forlì</i>
Mancini F.	<i>HERA SpA, Ravenna</i>
Manuppella A.	<i>ARPA Molise, Isernia</i>
Miana P.	<i>VESTA SpA, Venezia</i>
Mirolo G.	<i>ARPA, Ferrara</i>
Montemurro P.	<i>Acquedotto Pugliese SpA, Bari</i>
Nusca A.	<i>Istituto Superiore di Sanità, Roma</i>
Palumbo F.	<i>Iride Acqua Gas SpA, Genova (ex Az. Mediterranea Gas e Acqua - AMGA SpA)</i>
Panà A.	<i>Università di Tor Vergata, Roma</i>
Piovano B.	<i>ARPA Piemonte, Torino</i>
Pompei M.	<i>Centro Ricerche Marine S conspA, Cesenatico</i>
Sangiuolo A.	<i>ARPA Liguria, Genova</i>
Semproni M.	<i>Istituto Superiore di Sanità, Roma</i>
Viglione D.	<i>ARPA Liguria, Genova</i>

**Partecipanti ai confronti interlaboratorio per la verifica
dell'equivalenza dei metodi e per la valutazione delle prestazioni**

Coordinatore: L. Bonadonna, Istituto Superiore di Sanità

Alava F.	<i>BAS-SII, Bergamo</i>
Bacchi M.	<i>ARPA Emilia Romagna, Forlì</i>
Barone E.	<i>ARPA Molise, Isernia</i>
Battistini I.	<i>ARPA Emilia Romagna, Ferrara</i>
Berchielli S.	<i>Publiacqua SpA, Firenze</i>
Bonanni E.	<i>LaboratoRI SpA (Gruppo ACEA)</i>
Borelli M.E.	<i>Iride Acqua Gas SpA, Genova (ex Az. Mediterranea Gas e Acqua - AMGA SpA)</i>
Briancesco R.	<i>Istituto Superiore di Sanità, Roma</i>
Buda D.	<i>Centro Ricerche Marine S. cons.p.A., Cesenatico</i>
Burrini D.	<i>Publiacqua SpA, Firenze</i>
Cataldo C.	<i>Istituto Superiore di Sanità, Roma</i>
Centurelli P.	<i>BAS-SII, Bergamo</i>
Cerato L.	<i>VESTA SpA, Venezia</i>
Cirillo G.	<i>ARPA Emilia Romagna, Forlì</i>
Della Libera S.	<i>Istituto Superiore di Sanità, Roma</i>
Di Pardo L.	<i>ARPA Molise, Isernia</i>
Ducceschi P.	<i>ARPAT Toscana, Pistoia</i>
Ferrari G.	<i>ASL di Vallecamonica-Sebino, Darfo Boario Terme</i>
Foresi M.	<i>LaboratoRI SpA (Gruppo ACEA)</i>
Manuppella A.	<i>ARPA Molise, Isernia</i>
Melloni A.	<i>ARPA Molise, Isernia</i>
Miana P.	<i>VESTA SpA, Venezia</i>
Milandri S.	<i>Centro Ricerche Marine S conspA, Cesenatico</i>
Mirolo G.	<i>ARPA Emilia Romagna, Ferrara</i>
Montemurro P.	<i>Acquedotto Pugliese SpA, Bari</i>
Niemelä S.I.	<i>Università di Helsinki, Finlandia</i>
Ottaviano C.	<i>LaboratoRI SpA (Gruppo ACEA)</i>
Palumbo F.	<i>Iride Acqua Gas SpA, Genova (ex Az. Mediterranea Gas e Acqua - AMGA SpA)</i>
Piano A.	<i>Università La Sapienza, Roma</i>
Panisi M.	<i>ARPA Lombardia, Brescia</i>
Perilli G.	<i>Acquedotto Pugliese SpA, Bari</i>
Piovano B. e coll.	<i>ARPA Piemonte, Torino</i>
Polizzi T.	<i>Iride Acqua Gas SpA, Genova (ex Az. Mediterranea Gas e Acqua - AMGA SpA)</i>
Riolfo G.	<i>VESTA SpA, Venezia</i>
Sanguuolo A.	<i>ARPA Liguria, Genova</i>
Savio A.	<i>ASL di Vallecamonica-Sebino, Darfo Boario Terme</i>
Semproni M.	<i>Istituto Superiore di Sanità, Roma</i>
Viglione D.	<i>ARPA Liguria, Genova</i>
Zoffoli S.	<i>VESTA SpA, Venezia</i>

INDICE

Criteria di applicazione delle procedure e dei metodi di riferimento per il controllo delle acque destinate al consumo umano	1
Lineamenti di tecniche analitiche nella microbiologia ambientale	4
Linee guida per le buone pratiche di laboratorio.	
Analisi microbiologica delle acque	9
Modalità di campionamento e conservazione dei campioni	17
Determinazione di <i>Escherichia coli</i>	21
Determinazione degli Enterococchi	32
Determinazione di <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
Conteggio delle colonie su agar a 22 °C e 37 °C	45
Determinazione di <i>Clostridium perfringens</i>	48
Determinazione dei Batteri coliformi a 37 °C	58
Determinazione delle Alghe	70
Determinazione dei Batteriofagi anti-<i>Escherichia coli</i>	76
Determinazione dei Batteriofagi a RNA F-specifici	88
Determinazione dei Nematodi a vita libera	98
Determinazione degli enterobatteri patogeni: <i>Salmonella</i>	105
Determinazione degli enterobatteri patogeni: <i>Shigella</i>	120
Determinazione degli enterobatteri patogeni: <i>Vibrio</i>	133
Determinazione di batteri opportunisti patogeni: <i>Aeromonas spp</i>	139
Determinazione degli Enterovirus	144
Determinazione dei Funghi	161
Determinazione di cisti di <i>Giardia</i> e oocisti di <i>Cryptosporidium</i>	168
Determinazione degli Stafilococchi patogeni	188
Appendice	
Attrezzature di base per le analisi microbiologiche delle acque	197

CRITERI DI APPLICAZIONE DELLE PROCEDURE E DEI METODI DI RIFERIMENTO PER IL CONTROLLO DELLE ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO

La necessità di adeguare al progresso scientifico e tecnologico gli strumenti di controllo del rischio sanitario associato alla qualità delle acque destinate al consumo umano, ha indotto – a livello europeo – una ridefinizione delle norme qualitative che presiedono alla salubrità delle acque e, nel contempo, un aggiornamento delle strategie e dei metodi di sorveglianza.

Sul piano normativo è stata adottata la Direttiva 98/83/EC, recepita in Italia con il Decreto Legislativo 2 febbraio 2001 n. 31 e successive modifiche e integrazioni (DL.vo 27/2002), che stabilisce le caratteristiche di qualità essenziali per tutte le acque, trattate o non trattate, destinate a uso potabile o per la preparazione di cibi in ambito domestico e tutte le acque utilizzate in imprese alimentari per la fabbricazione, il trattamento, la conservazione o l'immissione sul mercato di prodotti o sostanze destinate al consumo umano.

Il decreto ha introdotto alcuni aspetti di sostanziale innovazione nel quadro della protezione della salute umana dagli effetti negativi derivanti dalla contaminazione delle acque, fissando, come criterio base per il controllo, l'osservanza di una serie di parametri di rilevanza sanitaria (allegato I parte A e B) e di altri parametri "indicatori" di variazioni anomale della qualità dell'acqua (allegato I parte C).

Tra gli elementi salienti dell'attuale quadro normativo figurano, in primo luogo, l'adozione di un sistema di prevenzione dei rischi basato su procedure standardizzate, l'esecuzione dei controlli analitici al punto d'uso (rubinetto di utenza), l'introduzione del giudizio di deroga per i parametri chimici, il riconoscimento del diritto del consumatore ad essere informato in modo adeguato e tempestivo sulla qualità dell'acqua. Nello stesso quadro, al fine di garantire l'idoneità dei dati analitici alle funzioni del monitoraggio e alla stima dell'esposizione e per assicurare l'affidabilità e la comparabilità dei risultati nell'ambito dei controlli interni ed esterni, sono previsti l'utilizzo di metodi analitici di riferimento e l'adozione di procedure di controllo analitico della qualità.

In tale contesto, e in linea di continuità con i lavori intrapresi nell'ambito del Comitato Permanente di Studio sulle acque (ex art. 9, DM 26 marzo 1991) presso il Ministero della Salute e della II Sottocommissione di Studio "Metodi Analitici", questo Istituto è stato incaricato di predisporre i metodi di analisi di riferimento da impiegare per i controlli sulla qualità delle acque destinate al consumo umano ai sensi della vigente normativa.

Nell'ambito di tale mandato sono stati realizzati due volumi che raccolgono i metodi analitici microbiologici e chimici di riferimento di cui all'art. 11, comma 1, lettera d del DL.vo n. 31 del 2001 per l'attuazione delle attività analitiche di controllo della qualità delle acque destinate al consumo umano.

Le procedure e i metodi analitici microbiologici raccolti in questo volume, e riportati in uno schema sinottico in tabella 1, si riferiscono a tutti i controlli previsti nell'Allegato I parte A e C e nell'Avvertenza, e sono inoltre utilizzabili per il monitoraggio di alcuni parametri addizionali ad oggi non regolamentati che possono rivestire un carattere di particolare interesse sanitario ed emergenza, come nel caso di *Aeromonas*, batteriofagi RNA F-specifici, *Giardia*, *Cryptosporidium*. Per alcuni parametri, il campo di applicazione del metodo è esteso anche alle acque di piscina e alle acque di dialisi.

In considerazione dell'evoluzione tecnologica nel campo delle metodologie analitiche, accanto a metodiche basate su tecniche analitiche convenzionali, il volume include anche metodi che prevedono l'impiego di tecniche strumentali avanzate, quali metodi di

immunofluorescenza e molecolari e metodi rapidi di nuova concezione, vantaggiosi in termini di produttività, precisione e riduzione dei tempi di risposta, criterio di particolare rilievo quando si tratti di acque destinate al consumo umano. Ad integrazione delle procedure di controllo per il monitoraggio della qualità delle acque, comprensive anche dei metodi microbiologici alternativi ricavati ai sensi della Direttiva 98/83/EC, dall'art. 11, comma 1 c del DL.vo n. 31 e dalla norma ISO 17994, sono riportati anche i criteri e le procedure di campionamento e di buone pratiche di laboratorio per l'assicurazione di qualità del dato.

In analogia con l'approccio adottato in precedenza per le edizioni dei metodi prodotti nel 1997 e nel 2000 (Rapporti ISTISAN 97/8 e 00/14), i lavori della Sottocommissione hanno coinvolto esperti del Ministero della Salute e dell'Istituto Superiore di Sanità ed esperti e tecnici appartenenti a numerose istituzioni nazionali, quali Università, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Aziende Sanitarie Locali, Agenzie Regionali per la Prevenzione e l'Ambiente e Aziende acquedottistiche. In relazione ai parametri microbiologici inseriti nell'Avvertenza, si è voluto garantire la diffusione di metodi ampiamente testati, largamente adottati per i controlli di routine e in molti casi utilizzati da laboratori accreditati in conformità alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025.

Al fine di fornire elementi utili per la garanzia della qualità del dato, sono state, in alcuni casi, indicate le caratteristiche di prestazione del metodo, riferite a confronti interlaboratorio svolti a livello internazionale o nazionale o ricavate da metodi analoghi consolidati e adottati in contesti internazionali.

I metodi analitici di riferimento presentati, alcuni dei quali sono stati in precedenza pubblicati sul sito web dell'Istituto Superiore di Sanità, come è comune prassi a livello internazionale, sono emanati dal Reparto di Igiene delle Acque Interne del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria. Pertanto, la corrente edizione dei metodi integra o sostituisce, nei casi indicati in Tabella 1, le metodiche pubblicate nei Rapporti ISTISAN 97/8 e 00/14 e costituisce, a tutti gli effetti, l'ultima versione valida per i controlli interni ed esterni disposti dal DL.vo 31/2001 e s.m.i., e secondo quanto previsto al punto 5.4.2 della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025.

Per quanto riguarda infine l'adozione da parte dei laboratori dei metodi presentati si ritiene utile richiamare la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 che, al punto 5.4.1, indica che "non è necessario completare o riscrivere, sottoforma di procedure interne, le norme internazionali, regionali o nazionali o altre specifiche riconosciute che contengono sufficienti e concise informazioni su come eseguire le prove e/o le tarature, se queste norme sono scritte in modo tale da essere utilizzate, così come pubblicate, dal personale operativo nel laboratorio. Tuttavia, può essere necessario fornire una documentazione aggiuntiva per parti facoltative del metodo o dettagli supplementari".

Il Coordinatore della II Sottocommissione
del Comitato Permanente di Studio

Dott. Massimo Ottaviani

Tabella 1. Schema sinottico delle metodologie per il controllo analitico delle acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo n. 31/2001

Parametro	Rif. DL.vo 31/2001 Allegato I	Principio del metodo	Codice del metodo	Rif. prec. edizioni
<i>Escherichia coli</i>	Parte A	MPN (*) a multi-pozzetto	ISS A 001A rev. 00	-
		Filtrazione su membrana	ISS A 001B rev. 00	-
		Filtrazione su membrana	ISS A 001C rev. 00	-
Enterococchi	Parte A	Filtrazione su membrana	ISS A 002A rev. 00	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Parte A e Avvertenza	Filtrazione su membrana	ISS A 003A rev. 00	sostituisce 00/14 p. 353
Conteggio colonie	Parte A e C	Inclusione in agar	ISS A 004A rev. 00	sostituisce 97/8 p. 179
<i>Clostridium perfringens</i>	Parte C	Filtrazione su membrana	ISS A 005A rev. 00	-
		Filtrazione su membrana	ISS A 005B rev. 00	-
Coliformi a 37 °C	Parte C	MPN (*) a multi-pozzetto	ISS A 006A rev. 00	-
		Filtrazione su membrana	ISS A 006B rev. 00	sostituisce 97/8 p. 156
		Filtrazione su membrana	ISS A 006C rev. 00	-
Alghe	Avvertenza	Sedimentazione con tecnica di microscopia	ISS A 007A rev. 00	sostituisce 00/14 p. 245
Batteriofagi anti- <i>Escherichia coli</i>	Avvertenza	MPN (*)	ISS A 008A rev. 00	sostituiscono
		Conteggio placche di lisi	ISS A 008B rev. 00	00/14 p. 275
		Presenza/Assenza	ISS A 008C rev. 00	
Batteriofagi a RNA F Specifici	Supplementare	Produzione placche di lisi	ISS A 009A rev. 00	-
Nematodi a vita libera	Avvertenza	Sedimentazione con tecnica di microscopia	ISS A 010A rev. 00	-
		Filtrazione su membrana con tecnica di microscopia	ISS A 010B rev. 00	-
<i>Salmonella</i>	Avvertenza	Presenza/Assenza	ISS A 011A rev. 00	sostituiscono
		Presenza/Assenza	ISS A 011B rev. 00	00/14 p. 361
		Presenza/Assenza	ISS A 011C rev. 00	
<i>Shigella</i>	Avvertenza	Presenza/Assenza	ISS A 012A rev. 00	sostituiscono
		Presenza/Assenza	ISS A 012B rev. 00	00/14 p. 371
		Presenza/Assenza	ISS A 012C rev. 00	
<i>Vibrio</i>	Avvertenza	Presenza/Assenza	ISS A 013A rev. 00	sostituisce 00/14 p. 399
<i>Aeromonas</i>	Supplementare	Filtrazione su membrana	ISS A 014A rev. 00	sostituisce 00/14 p. 407
Enterovirus	Avvertenza	Concentrazione e isolamento su colture cellulari, immunofluoresc., ELISA, pcr	ISS A 015A rev. 00	sostituisce 00/14 p. 309
Funghi	Avvertenza	Filtrazione su membrana	ISS A 016A rev. 00	sostituiscono
		Filtrazione su membrana	ISS A 016B rev. 00	00/14 p. 329
		Filtrazione su membrana	ISS A 016C rev. 00	
<i>Giardia e Cryptosporidium</i>	Avvertenza e nota	Filtrazione su capsula e immunofluoresc. diretta	ISS A 017A rev. 00	sostituisce 00/14 p. 335
		Filtrazione su filtri di dischi di schiuma compressa e immunofluoresc. diretta	ISS A 017B rev. 00	-
		PCR e nested PCR	ISS A 017C rev. 00	-
		RT-PCR	ISS A 017D rev. 00	-
<i>Stafilococchi patogeni</i>	Avvertenza	Filtrazione su membrana	ISS A 018A rev. 00	sostituisce 00/14 p. 387
		Filtrazione su membrana	ISS A 018B rev. 00	-

(*) Most Probable Number

LINEAMENTI DI TECNICHE ANALITICHE NELLA MICROBIOLOGIA AMBIENTALE

0. Generalità e definizioni

La definizione di metodo adottata dai chimici è generale a tal punto che si può applicare anche alla microbiologia. Il documento CEN TC 230/WG 1/TG 4 “Guida per il controllo di qualità analitico dell’analisi dell’acqua” riporta la seguente definizione: “Il metodo analitico è la serie di procedure scritte e seguite dal tecnico di laboratorio”.

Tutte le determinazioni da eseguire nell’analisi microbiologica delle acque sono legate a un metodo e, generalmente, i metodi standardizzati riportano la descrizione della procedura da seguire in dettaglio. In alcuni casi, i metodi sono specificati in norme tecniche di applicazione della legislazione nazionale, o è la stessa normativa che indica l’ente che deve fornirli, in quei casi si considerano metodi ufficiali nazionali. Metodi standardizzati sono anche disponibili presso diverse organizzazioni internazionali quali: ISO (*International Standards Organization*), CEN (*Comité Européen de Normalisation*), IDF (*International Dairy Federation*), AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) o presso singoli enti di standardizzazione nazionali.

Negli anni più recenti, inoltre, c’è la tendenza, da parte delle normative internazionali ed europee in particolare, all’unificazione delle procedure analitiche per ogni diversa tipologia di acqua. L’obbligo è quello di utilizzare metodi uguali o almeno equivalenti a quelli proposti, per ottenere risultati confrontabili e determinare, in maniera uniforme, la qualità delle acque.

È noto che non tutti i metodi microbiologici sono idonei all’analisi di tutti i tipi di matrici ambientali. La stessa analisi di acque con caratteristiche di qualità diverse (acque superficiali dolci e marine, acque sotterranee, acque reflue e ad uso irriguo, acque sottoposte a trattamenti di potabilizzazione e acque disinfettate) comporta l’uso di metodi diversi che tengano conto delle marcate differenze di natura chimica, chimico-fisica e biologica.

In generale, due procedure analitiche che differiscono per singoli dettagli dovrebbero essere considerate come metodi differenti. Tuttavia, in microbiologia, differenze, per esempio, nelle diluizioni usate non sono solitamente considerate motivi sufficienti per definire che si tratta di metodi differenti. Invece, differenze nella formulazione del terreno di coltura, nel principio del metodo e le differenze nei tempi/temperature di incubazione vanno sicuramente a definire metodi di analisi diversi.

I risultati di un controllo microbiologico sono sempre definiti dal metodo usato. Quando, ad esempio, si esamina lo stesso campione con metodi diversi, si ottengono risultati diversi. Questo è particolarmente vero per l’isolamento di organismi bersaglio che non sono inequivocabilmente definiti dal metodo, ma anche per organismi bersaglio definiti in base all’ordinamento tassonomico. Anche la vitalità di un microrganismo può influire sul rilevamento; microrganismi danneggiati o stressati dalle condizioni ambientali possono rispondere in modo diverso alle condizioni standard di laboratorio. Metodi diversi inoltre copriranno porzioni differenti della popolazione microbica. Ne è esempio il confronto tra conteggi di microscopia e conteggi su terreni di coltura estremamente selettivi, ovvero anche da risultati ottenuti con terreni di coltura particolarmente ricchi o poveri in nutrienti organici.

Non esiste nessun criterio obiettivo che permetta di stabilire quale metodo dia risultati migliori, in quanto il risultato dipende anche dagli scopi dell’analisi. Tuttavia, esistono norme specifiche che mettono in grado di valutare l’equivalenza tra metodi analitici microbiologici. Le procedure analitiche e le successive valutazioni statistiche, necessarie per addivenire al risultato, sono impegnative e necessitano della collaborazione di statistici esperti nel campo specifico.

1. Metodi di analisi

1.1. Metodi tradizionali

1.1.1. Tecnica dei tubi multipli o del numero più probabile (MPN)

Il metodo dei tubi multipli fornisce una stima statistica della densità batterica del campione analizzato. Si basa infatti sulla combinazione dei tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido.

Nei metodi in terreno liquido, l'aliquota da saggiare viene inoculata in un terreno di crescita formulato per stimolare lo sviluppo degli organismi bersaglio e per inibire lo sviluppo di tutti gli altri organismi (flora interferente). La natura selettiva del terreno è rafforzata dalla scelta di una temperatura e di un tempo di incubazione idonei. Se l'organismo bersaglio è presente nell'aliquota di campione, si produrrà normalmente un segnale positivo, indipendentemente dalla concentrazione iniziale.

Nella forma più semplice, un metodo di crescita in terreno liquido dà un'informazione del tipo presenza/assenza. Per ottenere un'informazione semi-quantitativa, si esamina invece, con la tecnica del Numero Più Probabile (MPN), una serie di volumi generalmente scalari in replica. La precisione di questo metodo è bassa (ad esempio l'intervallo di confidenza del 95% di un'analisi con l'MPN a cinque repliche si trova approssimativamente tra un terzo del risultato analitico e tre volte il medesimo). Tuttavia l'imprecisione del metodo può essere evitata aumentando il numero di inoculi in parallelo con conseguente aumento della precisione che è inversamente proporzionale alla radice quadrata del numero di inoculi in parallelo.

I volumi di acqua che possono essere esaminati con questa tecnica sono ridotti in considerazione delle difficoltà tecniche di preparazione e distribuzione di aliquote elevate del campione di acqua da esaminare. La tecnica dell'MPN tradizionale, mentre è superata per l'analisi di acque trattate, è ancora consigliabile per l'analisi di acque con particolato in sospensione, di fanghi, sedimenti e sabbie.

1.1.2. Conteggio delle colonie

Nella forma più semplice, il metodo di conta diretta si esegue inoculando un'aliquota nota di campione sulla superficie di un terreno di coltura agarizzato selettivo o non selettivo (metodo della semina in superficie). Ogni singola cellula dell'organismo bersaglio si moltiplicherà formando una colonia visibile ad occhio nudo. I risultati di questo tipo di analisi sono espressi pertanto come la concentrazione (numero) di unità che formano una colonia (UFC) per unità di volume. Si accetta che ogni UFC rappresenti una o più cellule dell'organismo bersaglio nel campione originario e che, pertanto, la conta riporti direttamente il numero di batteri presenti. L'accuratezza del risultato dipende dal numero di colonie contate. È necessario, quindi, che il numero delle colonie cresciute sia compreso in limiti leggibili. Un numero di colonie compreso generalmente tra 20 e 80 e non superiore a 200 fornisce un risultato accettabile e statisticamente accurato.

Un'elaborazione del metodo è rappresentata dal metodo della semina per inclusione, in cui un'aliquota nota di campione viene miscelata al terreno di coltura agarizzato liquefatto e incubato dopo solidificazione. L'ulteriore evoluzione del metodo ha condotto all'uso del metodo di filtrazione su membrana (MF), in cui l'aliquota viene filtrata attraverso una membrana (generalmente con porosità nominale di 0,45 µm) successivamente posta sul terreno di coltura agarizzato in capsula di Petri. In particolare, la metodica della filtrazione si adatta a tutti i tipi di acqua, tranne che a quelle particolarmente torbide. Consente di ottenere risultati in tempi più brevi (24÷48 ore) rispetto a quelli richiesti con il metodo del numero più probabile (24÷96 ore); inoltre permette di esaminare anche grandi volumi di acqua di buona qualità.

Un ulteriore sviluppo della tecnica per la determinazione dei parametri microbiologici deriva dallo sfruttamento dell'attività metabolica di specifici enzimi cellulari dei batteri. Anche in questo caso, con l'uso di specifici substrati, tramite l'idrolisi enzimatica di sostanze fluorofore, si ottengono risultati più rapidi e di migliore lettura.

A volte non basta inoculare semplicemente un'aliquota di campione nel terreno di coltura o sulla sua superficie, per ottenere risultati precisi. Le cellule degli organismi bersaglio possono essere

danneggiate e può essere necessario rivitalizzarle prima di metterle a contatto col terreno di coltura selettivo. Tale procedura, indicata come rivitalizzazione, può essere parte integrante del metodo di controllo e implica generalmente l'incubazione in un terreno di coltura meno selettivo e/o a una temperatura meno stressante.

Spesso può risultare necessario confermare i risultati presuntivi positivi tramite uno o più prove di conferma o perfino procedere all'identificazione del genere, della specie o del sierotipo.

A determinare il livello necessario di conferma e di identificazione dei microrganismi isolati sono comunque gli obiettivi dell'analisi.

1.2. Metodi rapidi

Requisito essenziale per un metodo rapido è quello di fornire risultati nel più breve tempo possibile. Una maggiore rapidità nella risposta rispetto ai metodi analitici più tradizionali dà l'indubbio vantaggio di ottenere in tempi più brevi il segnale dell'eventuale presenza di una contaminazione, requisito prioritario in un contesto di prevenzione e tutela della salute pubblica.

Per i patogeni e per i batteri indicatori di contaminazione fecale, l'ideale sarebbe avere i risultati dell'analisi almeno nello stesso giorno del prelievo del campione.

Al momento attuale, numerosi sono i metodi cosiddetti rapidi disponibili in commercio e alcuni, ancora più rapidi, sono considerati metodi di *early warning*, avviso preventivo.

Gran parte dei metodi con questa caratteristica, attualmente disponibili, sono stati elaborati per la determinazione degli indicatori di contaminazione fecale e spesso sono basati sullo stesso principio. Nella maggior parte dei casi sono in grado di fornire il risultato dell'analisi entro 18-24 ore, alcuni perfino entro 10-12 ore e, rispetto ai metodi tradizionali, che necessitano della conferma degli isolati – con conseguente allungamento dei tempi della risposta (48÷72 ore o oltre) – hanno generalmente maggiore specificità, precisione e sensibilità e non richiedono lo svolgimento di prove di conferma.

Negli ultimi venti anni sono stati sviluppati diversi nuovi metodi che si basano sulla tecnica della filtrazione per membrana, del numero più probabile o di Presenza/Assenza e che sfruttano, in genere, l'attività metabolica di specifici enzimi cellulari dei batteri. Enzimi come β -D-galattosidasi, β -D-glucuronidasi, β -D-glucosidasi e amino-peptidasi sono quasi esclusivi dei batteri coliformi, di *Escherichia coli*, degli enterococchi e di *Pseudomonas aeruginosa*, rispettivamente. L'uso di specifici substrati, tramite l'idrolisi enzimatica di sostanze cromofore o fluorofore, permette di selezionare i microrganismi ricercati senza necessità di svolgere ulteriori prove per la conferma dell'appartenenza al genere o alla specie.

Sebbene negli anni più recenti si siano moltiplicati i metodi enzimatici che usano la tecnica della filtrazione su membrana, quelli che hanno avuto riconoscimenti e approvazioni ufficiali da enti di normalizzazione internazionali (*International Standards Organization* – ISO, *Association of Official Analytical Chemists* – AOAC) o che sono stati standardizzati a livello nazionale sono stati i metodi ad inoculo multiplo (MPN). Rispetto alla tecnica MPN più classica, le nuove tecniche prevedono l'aumento del numero di inoculi del campione in parallelo, con conseguente aumento della precisione che diventa equiparabile o anche superiore a quella della tecnica di conta diretta. La caratteristica di queste tecniche è la miniaturizzazione a pozzetti e la facilità di esecuzione e di lettura dei risultati che sono comunque meno soggetti ad un'interpretazione arbitraria da parte degli operatori.

Tra questi metodi, il Colilert Quanti-Tray a multi-pozzetto è, al momento attuale, il metodo riconosciuto per l'analisi delle acque potabili nella gran parte dei paesi dell'Unione Europea e in alcune decine di paesi nel mondo. Inoltre è stato approvato da organizzazioni quali l'USEPA e l'AOAC. Il metodo consente di determinare contemporaneamente, alla stessa temperatura di incubazione, coliformi ed *E. coli* entro 18-22 ore. La tecnica è estremamente facile da eseguire e richiede l'aggiunta del campione alla polvere disidratata che contiene orto-nitrofenil- β -D-galattosidasi (ONPG) e 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronidasi (MUG). Lo sviluppo di un colore giallo è considerato come reazione positiva per i coliformi, mentre un colore giallo associato al blu fluorescente sotto la lampada di Wood (ultravioletto) conferma la presenza di *E. coli*. Lo stesso principio viene applicato per la determinazione degli enterococchi in 24 ore con l'uso di un substrato che contiene il 4-metilumbelliferil- β -D-glucoside (MUD). Queste tecniche sono idonee anche all'analisi di acque marine, superficiali, reflue e di fanghi di depurazione. Un metodo analogo, ma miniaturizzato a 96 pozzetti, utile alla determinazione in acque

superficiali di *E. coli* e degli enterococchi separatamente, è stato approvato dall'ISO nel 1998, ed è attualmente tra i metodi previsti dalla nuova direttiva per l'analisi delle acque di balneazione.

Un metodo rapido per la determinazione del parametro "Conteggio delle colonie" è stato recentemente approvato in Gran Bretagna e si sta rapidamente diffondendo in altri paesi.

Tra i metodi di Presenza/Assenza basati sull'attività enzimatica dei batteri, un metodo semi-automatico di *early warning* permette l'analisi contemporanea di 80 campioni. È idoneo per il rilevamento di coliformi, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Comparato, con risultati promettenti, con i metodi standardizzati attualmente indicati per l'analisi delle acque destinate al consumo umano dà la possibilità di ottenere risultati in meno di 1 ora con concentrazioni di coliformi superiori a 1000 UFC/100 mL, mentre in 10 ore consente di rilevare concentrazioni di *E. coli* variabili tra 1 e 5 UFC/100 mL.

1.3. Metodi molecolari

I passi avanti della biologia molecolare negli ultimi 20 anni hanno portato allo sviluppo di nuovi metodi di ricerca dei microrganismi nelle acque basati sulla individuazione di specifiche sequenze geniche. Ad esempio, è possibile dimostrare la presenza di sequenze significative del genoma o di specifici RNA ribosomiali grazie all'ibridazione con idonee sonde molecolari (sequenze nucleotidiche complementari a tratti specifici del genoma) seguite da reazione di polimerizzazione a catena (PCR *Polymerase Chain Reaction*). Con lo sviluppo dell'amplificazione genica sono stati raggiunti livelli di sensibilità mai ottenuti con le altre tecniche di rilevazione tradizionali. Tali metodi sono usualmente rapidi e possono essere applicati per la ricerca sia di specifici patogeni che di gruppi di microrganismi. I metodi molecolari potranno avere nel futuro, un sempre maggiore impiego nel controllo della qualità delle risorse idriche utilizzate a scopo idropotabile, rappresentando una valida alternativa ai metodi di ricerca diretti basati sulla coltivazione in idonei substrati, soprattutto se si pensa a organismi non facilmente coltivabili o a situazioni di verifica di contaminazione da atti di sabotaggio o bioterrorismo.

1.3.1. PCR

La PCR è una reazione di amplificazione in vitro di un segmento specifico di DNA, ottenuta per mezzo di una DNA polimerasi a partire da una coppia di primer specifici. Con questo metodo piccole quantità di DNA possono essere selettivamente moltiplicate. In breve, una singola copia della sequenza specifica scelta in questo saggio può produrre più di un milione di identiche copie di DNA che possono poi essere individuate impiegando differenti metodi. Questo metodo è stato efficientemente messo a punto per la ricerca di diversi patogeni nelle acque e sono addirittura disponibili kit commerciali come, ad esempio, quello per la ricerca di *Legionella* in campioni di acqua.

La PCR può essere usata come metodo standard oppure venire modificata a *semi-nested* oppure *nested* PCR. Entrambi questi protocolli, dove una seconda reazione di PCR è sviluppata usando primer addizionali, migliorano l'efficienza di individuazione delle sequenze geniche attraverso ulteriori amplificazioni del DNA già amplificato. La PCR può inoltre essere impiegata per la ricerca, dopo retrotrascrizione (RT), di RNA messaggeri (mRNA) la cui presenza è indice della vitalità di un microrganismo. Infatti, il DNA è stabile in ambiente anche dopo la morte del microrganismo e quindi la sua presenza non è utilizzabile come indice di vitalità. Protocolli di RT-PCR sono stati messi a punto per la ricerca di protozoi e virus enterici nelle acque.

Uno dei problemi legati all'utilizzo della PCR è rappresentato dal fatto che, poiché questo metodo viene impiegato per ricercare microrganismi normalmente presenti in piccole quantità, i volumi di campione da utilizzare per l'analisi possono variare tra i 100-1000 mL, mentre per la reazione di PCR possono essere impiegati solo pochi microlitri di campione. Per ovviare a questo problema sono stati utilizzati diversi metodi di concentrazione che, però aumentano anche la quantità di sostanze inibitrici della PCR (es. acidi umici e fulvici) presenti nei campioni d'acqua.

I vantaggi della PCR risiedono nella elevata sensibilità, rapidità e accuratezza del metodo. La PCR è, inoltre, una tecnica altamente specifica e di facile applicazione che permette di analizzare più campioni contemporaneamente; il costo è relativamente contenuto e dà la possibilità di evitare reazioni crociate eliminando i falsi positivi. Tuttavia questo metodo permette di effettuare solo una valutazione di tipo qualitativo.

Sono stati sviluppati anche metodi per quantificare i prodotti di PCR (Real Time-PCR) che, però, attualmente sono piuttosto costosi, non ancora standardizzati e richiedono personale specializzato. La PCR real-time consente di seguire l'accumulo del prodotto di PCR continuamente durante la reazione di amplificazione stessa. Con questa tecnica si possono impiegare diversi reagenti fluorescenti che, legando in modo specifico o aspecifico il DNA, permettono di seguire l'accumulo del prodotto di PCR mediante la misurazione di un segnale specifico in emissione. Se si utilizzano sonde a DNA il segnale emesso in seguito all'ibridazione della sonda sulla sua sequenza omologa corrisponde in modo specifico all'amplificazione del target: in altre parole, ogni evento di polimerizzazione dell'acido nucleico target (virale o microbico) è testimoniato dal rilascio in soluzione di una determinata quantità di fluorescenza della lunghezza d'onda di emissione tipica della sonda.

1.3.2. Ibridazione con sonde

Le tecniche di ibridazione si basano sul fatto che il DNA è una molecola a doppia elica (duplex) che può essere denaturata reversibilmente con alcali o calore. La reazione di riassociazione è molto specifica e dipende dalla complementarità delle due catene polinucleotidiche. Sequenze di DNA possono quindi essere riconosciute utilizzando una sonda (probe) polinucleotidica complementare a tratti specifici del genoma che si voglia individuare (bersaglio o target). La sonda si legherà in maniera specifica al bersaglio (preventivamente denaturato) e formerà con esso un DNA duplex ibrido, che potrà essere riconosciuto se la sonda è stata marcata con un rivelatore (tracciante) della reazione (esempio, enzimi o isotopi radioattivi). Questo tipo di saggio viene, ad esempio, impiegato per la ricerca degli enterovirus. Uno dei principali limiti delle sonde molecolari è quello di non poter distinguere tra particelle virali infettanti e non, inoltre la sensibilità delle sonde è troppo bassa per la rilevazione di virus in acque scarsamente contaminate. Una tipologia particolare di ibridazione con sonde è rappresentata dalla FISH (*Fluorescence In Situ Hybridisation*). Questo metodo implica l'uso di sonde geniche legate a marker fluorescenti, solitamente in grado di appaiarsi all'RNA ribosomiale 16S (16S rRNA). I microrganismi concentrati e fissati sono permeabilizzati e miscelati con la sonda. La temperatura di incubazione e l'aggiunta di composti chimici può influenzare il legame tra la sonda e la sequenza target. Poiché il segnale proveniente da una singola molecola di DNA fluorescente all'interno di un microrganismo non ne permette l'individuazione, è necessario selezionare una sequenza target con copie multiple nella cellula. Diversi metodi basati su questo protocollo sono stati sviluppati per la ricerca di coliformi ed enterococchi.

Sebbene vi siano risultati controversi per alcuni patogeni, in condizioni di stress, i microrganismi possono entrare in uno stadio vitale, non replicativo e non coltivabile (VNC). Recenti studi hanno permesso di concludere che i metodi basati sulla PCR e sulla FISH possono meglio evidenziare, rispetto ai metodi tradizionali, la presenza di patogeni e indicatori batterici vitali, anche nello stadio VNC.

Bibliografia

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th ed. Washington, DC: APHA; 2005.
2. Lightfoot NF and Maier EA (Eds.). *Analisi microbiologica degli alimenti e dell'acqua. Linee guida per l'assicurazione di qualità*. Pavia: La Goliardica Pavese; 2002.
3. Bonadonna L. Rapid analysis of microbial contamination of water. In: Tothill IE (Ed.). *Rapid and on-line instrumentation for food quality assurance*. New York: Woodhead Publishing in Food Science and Technology; 2003. p. 161-82.
4. Dalla Valle JM. Notes on the Most Probable Number index as used in bacteriology. *Publ Health Rep* 1941;58:299.
5. Dutka, BD. *Membrane filtration applications. Techniques and problems*. New York: Marcel Dekker Inc; 1981.

LINEE GUIDA PER LE BUONE PRATICHE DI LABORATORIO. ANALISI MICROBIOLOGICA DELLE ACQUE

0. Generalità e definizioni

Il controllo di qualità consiste in una serie di procedure che consentono di verificare la qualità di un prodotto e quella dei risultati ottenuti. È la valutazione continua dello stato delle procedure, dei metodi di analisi e dei dati prodotti dal laboratorio con l'obiettivo di ridurre al minimo tutte le circostanze che potrebbero comportare difformità rispetto ai risultati da raggiungere.

In relazione a ciò, per inciso, si ritiene opportuno riportare le definizioni di materiali di riferimento (MR) e materiali di riferimento certificati (MRC) sulla base delle Norme ISO Guide:

– *Materiali di riferimento (MR)*

materiale o sostanza per la quale uno o più valori delle proprietà sono sufficientemente omogenei e ben stabiliti da essere usati per la taratura di un apparecchio, per la valutazione di un metodo, per la misurazione o per l'assegnazione di valori a materiali.

– *Materiali di riferimento certificati (MRC)*

materiale di riferimento accompagnato da un certificato, per il quale uno o più valori delle proprietà sono certificati sulla base di una procedura che stabilisce il loro riferimento un'accurata realizzazione delle unità nelle quali i valori delle proprietà sono espressi e per il quale ciascun valore certificato è accompagnato da un'incertezza ad un calcolato livello di confidenza.

L'attuazione di programmi di controllo di qualità, che comporta un grosso carico di lavoro, è comunque necessaria se si considerano gli effetti sui risultati finali. L'applicazione di procedure di controllo, che prevedono un monitoraggio continuo di tutte le attività del laboratorio e dei materiali utilizzati, risulta imprescindibile dalla riproducibilità, precisione e accuratezza dei dati prodotti in quanto conduce all'identificazione, riduzione o eliminazione di errori casuali, sistematici o grossolani.

1. Ambienti di lavoro

Le condizioni ambientali dei locali dove vengono effettuate determinazioni microbiologiche devono essere tali da non invalidare i risultati, né influenzare l'incertezza di misura e garantire la sicurezza degli operatori.

Per produrre risultati di qualità servono presupposti adeguati. Un'organizzazione idonea del laboratorio, la sua collocazione, le condizioni strutturali e ambientali, esterne e interne possono avere influenza sul personale, sul funzionamento delle attrezzature e anche sull'efficienza e l'efficacia del programma di assicurazione di qualità.

I requisiti di base che dovrebbe possedere un laboratorio e il suo ambiente per essere in grado di produrre risultati di qualità schematicamente dovrebbero basarsi su:

- spazio sufficiente;
- disposizione concepita per l'efficienza;
- spazio sufficiente per le attrezzature;
- ufficio per il personale amministrativo;
- guardaroba per tutto il personale;
- depositi per i campioni, le attrezzature, i prodotti chimici e la vetreria.

Le funzioni di base del laboratorio dovrebbero svolgersi preferibilmente in aree separate o in parti definite della zona principale del laboratorio, distinguendo le zone in base alle operazioni da svolgere:

- pulizia della vetreria e attrezzature;
- sterilizzazione della vetreria usata e terreni di coltura incubati;
- preparazione e sterilizzazione dei terreni di coltura;
- inoculo di terreni di coltura;
- incubazione di colture;
- lettura dei risultati;
- interpretazione di risultati e stesura dei rapporti.

In condizioni ideali, un laboratorio di microbiologia dovrebbe comporsi di una serie di aree separate; in alternativa è comunque necessario che lo svolgimento del lavoro sia tale da distinguere le zone 'pulite' da quelle 'sporche'.

Dovrà essere garantita la sicurezza del personale. A tale scopo è opportuno tenere in considerazione quanto indicato dal DL.vo 626/1994 e successive modifiche e integrazioni dove vengono riportate anche le misure da applicare all'interno dei laboratori di microbiologia in funzione della natura degli agenti biologici da ricercare o trattare al fine di valutare i rischi per i lavoratori.

I laboratori microbiologici devono essere considerati ambienti contaminati e il sistema di ventilazione dovrebbe essere concepito in modo da evitare il passaggio dell'aria dai laboratori alle sale attigue. Qualora all'interno dei locali debba essere mantenuto un certo livello di temperatura, umidità e aerazione (ricambio d'aria), dovranno essere installati idonei sistemi di condizionamento e filtrazione dell'aria che non dovranno creare interferenze con l'esecuzione delle prove e compromettere l'attendibilità dei risultati.

I terreni di coltura, i prodotti chimici e i reattivi dovranno essere stoccati in zone protette dalla luce diretta del sole per non alterarne le prestazioni. I locali dovranno essere protetti da condizioni ambientali anomale quali umidità, polvere, temperature elevate, vibrazioni ed esposizione a luce solare diretta.

I locali dovranno essere tenuti chiusi durante l'esecuzione delle prove e ne dovrà essere vietato l'accesso a persone non autorizzate. In tutti i locali del laboratorio sarà tassativamente vietato fumare e, tramite opportune segnalazioni dovranno essere elencate le generali norme di igiene e di buon comportamento.

Tutte le apparecchiature e le sorgenti di alimentazione dovranno essere adatte alle prove da effettuare e l'adeguamento a particolari condizioni ambientali dovrà essere sottoposto a controllo.

Banconi, muri e pavimenti dovranno essere lisci, facili da pulire e disinfettare e adattabili a facili manutenzioni e riparazioni. I banconi dovranno essere attrezzati in modo idoneo con gas, dispositivi di scarico, elettricità, acqua distillata e rubinetti di acqua fredda e calda. Per le superfici di lavoro, si consiglia di effettuare, tramite l'uso di piastre a contatto, la determinazione della carica microbica, di muffe e lieviti dopo l'attività lavorativa e dopo la disinfezione per controllare l'efficienza della pulizia. Allo stesso modo si potranno applicare gli stessi controlli a termostati, frigoriferi e cappe e in casi di contaminazione si potrà procedere alla sanitizzazione. Tutte le operazioni di pulizia, disinfezione e sanitizzazione dovranno essere monitorate con idonei sistemi di controllo da porre in atto all'interno del laboratorio; di ogni operazione dovrà essere necessario tenere apposita registrazione.

Il monitoraggio biologico degli ambienti costituisce un punto basilare per avere la garanzia di operare in locali dove le prove non vengono influenzate da inquinamenti indipendenti dalla natura del materiale in esame. Un corretto monitoraggio biologico ambientale potrà comprendere controlli dell'aria, delle superfici di lavoro, dei termostati, dei frigoriferi e delle cappe a flusso laminare. Le frequenze dei controlli saranno definite all'interno di ogni laboratorio in funzione dell'effettivo carico inquinante gravitante nel laboratorio stesso.

Per il controllo dell'aria ambiente e dell'aria della cappa a flusso laminare si potranno utilizzare campionatori meccanici o l'eseguire l'analisi qualitativa gravitazionale con capsule contenenti terreni colturali lasciate aperte per un certo intervallo di tempo.

Nel caso i controlli e i processi di sanitizzazione non abbiano frequenze molto elevate, generalmente potranno essere mensili o semestrali, è bene, per dimostrare che le prove non vengono influenzate da eventuali inquinamenti ambientali, porre, ad ogni ciclo di determinazioni, una capsula di terreno colturale non seminato (bianco) che segua il normale ciclo lavorativo e che non dovrà presentare alcuna crescita alla fine del ciclo stesso.

2. Strumentazione

Le apparecchiature di prova in dotazione ad un laboratorio di microbiologia devono garantire affidabilità di funzionamento e di risposta in modo da non alterare l'accuratezza e la precisione del risultato finale della prova. Pertanto dovranno essere sempre tenute in perfetta efficienza e installate in locali che garantiscano una adeguata protezione dal deterioramento; l'efficienza dovrà essere garantita con opportune procedure per la manutenzione e la taratura.

Di seguito, per opportuna conoscenza, vengono riportate le definizioni di manutenzione ordinaria, straordinaria, programmata e di taratura.

- **Manutenzione ordinaria:** operazioni che devono essere messe in atto dall'operatore al momento dell'uso per garantire il buon funzionamento dell'apparecchiatura.
- **Manutenzione programmata:** intervento che viene effettuato a tempi prefissati per evitare decadimenti nel buon funzionamento dell'apparecchiatura. Questi interventi sono normalmente affidati alla ditta fornitrice con la quale si stipula un contratto di manutenzione annuale.
- **Manutenzione straordinaria:** intervento effettuato dopo il verificarsi di guasti o malfunzionamenti. Questo tipo di interventi vengono effettuati su specifica richiesta e vengono eseguiti normalmente da un tecnico specializzato della ditta fornitrice dopo che l'operatore ha verificato l'anomalia di comportamento.
- **Taratura:** operazione atta a garantire che l'apparecchio e lo strumento in uso siano in grado di fornire misure entro i limiti di tolleranza previsti dal capitolato d'acquisto. In senso stretto, la definizione si addice maggiormente a quelle apparecchiature che possono fare riferimento a strumenti campioni primari; per le altre può essere intesa come insieme di operazioni finalizzate al controllo del buon funzionamento dell'apparecchiatura.

Nell'ambito dei controlli da effettuarsi in laboratorio, sarà opportuno prevedere quindi:

- modalità di taratura e manutenzione
- loro frequenza
- personale responsabile delle verifiche

Per ogni apparecchiatura dovrà essere prevista un'apposita "Scheda" che dovrà riportare tutte le informazioni utili sulla provenienza, l'acquisto, l'installazione, il collaudo, le date di ricevimento e messa in funzione, i riferimenti alle procedure di taratura e manutenzione quando necessari, la loro periodicità e i dati del fornitore e dell'assistenza tecnica.

Dovrà essere predisposta inoltre una "Scheda di Manutenzione" che riporti tutte le operazioni effettuate relative alla verifica, alle sostituzioni, alla pulizia con la data di svolgimento dell'operazione e la firma del tecnico che l'ha effettuata.

Dovrà essere prevista inoltre una "Scheda di Taratura" su cui verrà riportato il riferimento alla procedura di taratura, il programma di taratura, la data di svolgimento della stessa e della futura taratura, la firma del tecnico e i riferimenti ai campioni primari o materiali di riferimento utilizzati per il controllo. Qualora la taratura venga attuata da un centro esterno dovrà essere riportata tutta la documentazione inerente.

Un'apparecchiatura che, a seguito di taratura, abbia rilevato una non idoneità al suo utilizzo, dovrà essere messa fuori servizio. L'evento dovrà essere segnalato apponendo un'etichetta visibile sull'apparecchiatura con la dicitura "Fuori Servizio" e la data in cui l'evento è stato rilevato. L'apparecchiatura non potrà essere in nessun modo utilizzata fino a quando la riparazione o la taratura di nuovo effettuata non dimostrino che è di nuovo funzionante. L'evento dovrà essere riportato sulla scheda di taratura.

Di seguito sono elencate le principali apparecchiature di un laboratorio di microbiologia dove vengono effettuati controlli di acque destinate al consumo umano; sono anche descritte le operazioni di base di manutenzione e taratura cui sottoporre le apparecchiature.

2.1. Cappa a flusso laminare

Per le cappe a flusso laminare le normali operazioni di manutenzione consistono nella sostituzione dei prefiltri secondo le indicazioni della ditta costruttrice, nella pulizia/disinfezione delle superfici interne

con opportuni disinfettanti e nel controllo dell'efficienza dei filtri. Se le cappe sono dotate di sistema a lampade a raggi ultravioletti, è necessario predisporre cicli di accensione a cappa chiusa con successiva attivazione del flusso per garantire l'allontanamento dell'ozono presente in atmosfera. Verificare periodicamente la presenza di microrganismi nell'aria filtrata esponendo per 30 minuti capsule di Petri aperte contenenti terreni colturali agarizzati per la crescita degli eterotrofi e dei miceti, disposte in punti rappresentativi della superficie di lavoro o, in alternativa, usare contatori di particelle.

2.2. Bilancia

Le bilance dovranno essere collocate su supporti stabili anti-vibrazioni e controllate che siano a bolla. Per la manutenzione si richiede la normale pulizia.

Per quanto riguarda il controllo, si utilizzano campioni di riferimento da confrontare almeno con frequenza annuale con campioni di riferimento primari. Almeno una volta l'anno è opportuno fare effettuare una taratura con materiale certificato verificando l'intervallo di misura completo della bilancia da personale qualificato o da un ente esterno che rilasci un certificato di taratura.

2.3. pHmetro

Gli elettrodi del pHmetro devono essere condizionati e conservati secondo le istruzioni del costruttore. Dopo ogni uso devono essere puliti con acqua distillata.

La taratura va effettuata periodicamente utilizzando soluzioni tampone di riferimento (es. pH 4 e pH 7 a 20 °C). Le soluzioni vanno conservate nelle migliori condizioni e non oltre la data di scadenza. Le aliquote giornaliere utilizzate devono poi essere scartate dopo la taratura.

Va inoltre controllato periodicamente lo stato di efficienza degli elettrodi registrando i valori in mV in corrispondenza delle tarature a pH 4 e pH 7. La differenza tra due misurazioni in rapporto al valore teorico indicato dal costruttore rappresenta un indice di invecchiamento dell'elettrodo.

2.4. Autoclave

L'autoclave va mantenuta in perfette condizioni operative. I controlli dello stato di sicurezza devono essere effettuati dagli enti preposti secondo le disposizioni legislative vigenti.

La taratura va effettuata almeno con frequenza annuale controllando la correlazione tra pressione e temperatura tramite un manometro campione certificato oppure va fatta effettuare da ditte specializzate che rilascino idoneo documento di avvenuta taratura.

In ogni caso è bene effettuare le operazioni di manutenzione di seguito indicate:

- verifica dell'efficienza del termometro nelle condizioni operative. Impostare la temperatura e il tempo di durata dei cicli richiesti e controllare che, quando l'autoclave è in pressione, il valore di temperatura sia conforme a quello riportato sulla tabella di correlazione pressione/temperatura del vapore saturo;
- verifica dell'efficienza del blocco del portello nelle condizioni di esercizio. Controllare che, quando è in corso il ciclo di sterilizzazione, il dispositivo di blocco del portello rimanga bloccato e il portello non si apra;
- verifica del livello dell'acqua. Prima dell'avvio di un ciclo di sterilizzazione controllare che il livello dell'acqua nell'autoclave sia compreso fra l'indice minimo e il massimo riportati sull'indicatore di livello;
- verifica funzionale dello sfiato. Mentre l'autoclave raggiunge la pressione di esercizio, verificare la tenuta delle valvole manuali di sfiato;
- verifica dello stato di conservazione della guarnizione del portello. Verificare che non vi siano rotture, scorie o frammenti; lubrificare con grasso al silicone, evitare l'uso di prodotti chimici;
- verifica dell'efficienza della valvola di sicurezza. Impostare un valore di pressione superiore al valore indicato dall'indice rosso sul manometro e controllare che, prima di raggiungere tale valore, la valvola di sicurezza cominci a sfiatare;

- controllo del dispositivo elettronico di livello. Mentre l'autoclave è in funzione, scaricare lentamente l'acqua aprendo il rubinetto di scarico e verificare che raggiunto il livello minimo intervenga l'allarme e si accenda la spia di segnalazione;
- ispezione della camera. Ispezionare l'interno della camera e del portello dell'autoclave per controllarne lo stato di conservazione; pulire le superfici interne con detergente idoneo per superfici in acciaio rimuovendo eventuali residui e incrostazioni;
- controllo dell'efficienza dei processi di sterilizzazione. Utilizzare indicatori biologici come strisce o ampole di spore di *Bacillus stearothermophilus* normalmente disponibili in commercio. Si consiglia di effettuare questo controllo con frequenza almeno mensile.

2.5. Incubatore

Le normali indicazioni d'uso prevedono la protezione delle pareti dell'incubatore dalla luce solare diretta. È da evitare inoltre l'introduzione di grandi quantità di materiale lasciando spazi per permettere la circolazione dell'aria.

La normale manutenzione prevede pulizia, decontaminazione e rimozione della polvere dal sistema di ventilazione. Occorre inoltre controllare giornalmente la temperatura dell'incubatore almeno con un termometro il cui bulbo sia immerso in glicerolo contenuto in una bottiglia sigillata, oppure, qualora ne siano dotati, controllando la temperatura indicata dal termometro permanente installato sull'apparecchiatura. La deviazione tra la temperatura impostata e quella rilevata non dovrà essere superiore a ± 1 °C per i termostati/frigotermostati impostati a 20 °C, a 36 °C e a 44 °C.

Per la taratura, e quindi per il controllo del termometro permanente, utilizzare un termometro di riferimento certificato (fatto tarare annualmente da un centro SIT) inserito nella camera del termostato e registrare i valori di temperatura per un intervallo di tempo di almeno 4 ore con frequenze di 30 min avendo cura di non aprire lo sportello del termostato durante l'esecuzione del controllo.

È bene annotare gli esiti del controllo di taratura su apposito registro, riportando per ogni rilevamento:

- l'ora in cui il rilevamento è stato effettuato;
- il valore di temperatura letto sul termometro campione di riferimento;
- il valore di temperatura letto sul termometro permanente installato sull'apparecchiatura;
- la deviazione evidenziata;
- la deviazione massima ammissibile;
- la data di effettuazione, la data del successivo controllo di taratura e la firma di chi l'ha effettuata.

2.6. Frigoriferi, celle frigorifere, congelatori

I frigoriferi e le celle frigorifere devono essere caricati in modo che l'aria circoli liberamente, e i congelatori caricati con accortezza in modo da mantenere all'interno una temperatura bassa.

Laddove è possibile, frigoriferi, termostati e congelatori dovrebbero essere messi sotto gruppo di continuità; in caso contrario sarebbe necessario predisporre sistemi che evidenzino le eventuali anomalie dovute al conseguente rialzo termico.

È opportuno tenere nettamente separati, all'interno dei frigoriferi, terreni di coltura e reagenti non inoculati da campioni da analizzare, ceppi di microrganismi e terreni inoculati.

Devono essere effettuate con cadenza periodica le operazioni che prevedano:

- rimozione della polvere dalle piastre esterne di aerazione
- sbrinamento
- pulizia e decontaminazione dell'interno delle celle, dei frigoriferi e dei congelatori.

Controllare periodicamente i termometri permanenti installati su frigoriferi e congelatori confrontandoli con un termometro campione di riferimento certificato e usando la stessa procedura indicata nel caso degli incubatori. Tenere anche per questi apposita registrazione.

2.7. Bagno termostatico

Per una buona manutenzione dei bagni termostatici è consigliabile effettuare periodicamente il controllo del livello del liquido, monitorare la temperatura del bagno, sostituire l'acqua contenuta nella vasca e sanitzare la vasca.

Controllare periodicamente i termometri permanenti installati confrontandoli con un termometro campione di riferimento certificato usando la stessa procedura indicata nel caso degli incubatori. Tenere anche per questi apposita registrazione.

2.8. Microscopio ottico

Collocare il microscopio in posizione stabile. Si consiglia la dotazione di un sistema per l'osservazione in contrasto di fase e di una serie di obiettivi, in modo da coprire un intervallo di ingrandimenti sufficientemente elevato, e di sistemi per la regolazione dell'intensità luminosa.

La manutenzione, eseguita da personale specializzato, consiste nella rimozione sia della polvere dagli oculari e dagli obiettivi usando cartine ottiche sia, dopo l'uso, di tracce di olio dagli obiettivi usati per immersione. Controllare saltuariamente la lubrificazione delle parti mobili e sostituire la lampada di illuminazione, quando necessario, seguendo le istruzioni della ditta costruttrice.

Quando non in uso, il microscopio va tenuto coperto e al riparo dalla luce, per evitare danni alle lenti.

2.9. Incubatore in atmosfera modificata

Si tratta di giare o apparecchiature atte ad ottenere e mantenere condizioni di atmosfera modificata (es. anaerobiosi) per tutta la durata del tempo di incubazione.

Porre attenzione all'inserimento del materiale, affinché avvenga nel più breve tempo possibile, in modo da non alterare sensibilmente le condizioni interne, e alla quantità del materiale stesso in relazione alle dimensioni dell'incubatore.

Sia che si tratti di giare che di incubatori, per la manutenzione bisognerà garantire le normali operazioni di pulizia e disinfezione.

Per quanto riguarda la taratura, nel caso di incubatori, seguire le indicazioni riportate nel paragrafo corrispondente.

È opportuno controllare il mantenimento delle condizioni atmosferiche adatte allo sviluppo dei microrganismi ricercati. In questo caso è possibile misurare la crescita di batteri riferibili a diverse specie, una inibita dalle condizioni atmosferiche e dalle temperature impostate e l'altra in grado di crescere nelle condizioni impostate.

Per la verifica si potranno utilizzare quindi ceppi ATCC certificati come controllo positivo e negativo. Si consiglia inoltre l'introduzione di indicatori redox, contenenti blu di metilene e resazurina atti a dimostrare l'avvenuto raggiungimento delle condizioni atmosferiche desiderate.

2.10. Micropipette

Micropipette manuali, elettroniche, monocanale o multicanale sono disponibili in commercio. Quelle manuali sono le più utilizzate all'interno dei laboratori. Si consiglia l'utilizzo di puntali monouso; inoltre è opportuno mantenere la pipetta a temperatura ambiente, evitare che subisca urti, tenerla in posizione verticale e procedere ad una regolare pulizia, manutenzione e taratura.

2.11. Dispensatore

Si intendono quelle apparecchiature utilizzate per distribuire terreni di coltura e reagenti in provette, bottiglie o capsule di Petri.

È opportuno controllare l'accuratezza dei volumi dispensati e, nel caso si debbano distribuire reagenti o terreni sterili, è opportuno controllare che le parti dell'apparecchio in contatto con essi siano in condizioni asettiche.

Mantenere le apparecchiature in perfette condizioni mediante accurata pulizia dopo ogni ciclo lavorativo, in accordo alle indicazioni della ditta costruttrice.

2.12. Termometri

I termometri in utilizzo presso il laboratorio devono essere tarati periodicamente mediante confronto con strumenti certificati da appositi enti. A titolo esemplificativo ci si può dotare di un termometro campione primario fatto tarare annualmente da un ente accreditato con cui effettuare tutte le verifiche indicate per incubatori, celle frigorifere, congelatori.

3. Materiali

3.1. Membrane filtranti

È preferibile utilizzare membrane sterili confezionate singolarmente o in nastri, purché sigillate e certificate dalla ditta produttrice. Registrare la data di ricevimento e il numero di ogni lotto di membrane acquistate e verificare la capacità di sviluppo di colonie batteriche.

3.2. Capsule di Petri

Preferire capsule in plastica sterile. È possibile effettuare il controllo di sterilità delle capsule in contemporanea con il normale controllo di fertilità.

3.3. Terreni di coltura

Preferire terreni disidratati o già pronti evitando di preparare i terreni dai singoli ingredienti. In questo caso, i risultati ottenuti dalle analisi potrebbero essere difforni rispetto ad analisi svolte utilizzando terreni disidratati e controllati dal produttore. Inoltre, le procedure di preparazione di terreni per singoli componenti, nel caso di sostanze tossiche, potrebbero costituire un rischio aggiuntivo per la salute degli operatori. In queste circostanze, è necessario adottare particolari cautele nella preparazione dei substrati e utilizzare dispositivi di protezione individuale (DPI).

Sulle confezioni di terreni di coltura disidratati e di reattivi (coloranti, additivi, soluzioni) reperibili in commercio apporre sia la data di ricevimento che quella di effettiva apertura. Se i reagenti e i terreni sono preparati in laboratorio per pesata dai costituenti di base, devono essere identificati con una etichetta riportante le seguenti informazioni: eventuale diluizione, data di preparazione, data di scadenza, modalità di conservazione, nome del preparatore, eventuali segnali di pericolosità.

Per controllare l'affidabilità e la conformità alle specifiche richieste si consiglia di effettuare i controlli di seguito elencati:

- Controllo del pH prima della sterilizzazione. Confrontare il valore misurato mediante pHmetro tarato, con quello dichiarato in etichetta e se la deviazione è superiore a quella ammessa modificare il pH mediante aggiunte di NaOH o HCl 0,1 N. Da effettuare ad ogni preparazione del terreno.
- Controllo della sterilità. Porre ad incubare una capsula o un tubo contenenti il solo terreno da testare secondo le modalità previste dal metodo analitico, e verificare la completa assenza di crescita batterica e fungina. In caso contrario, scartare tutto il lotto preparato e controllare le procedure di sterilizzazione e preparazione. Da effettuare ad ogni preparazione del terreno.
- Controllo della fertilità del terreno. Verificare la sua idoneità alla crescita del microrganismo target. Strisciare sulla superficie del terreno agarizzato o inoculare nel brodo un'ansata di una brodocoltura allestita con un ceppo puro certificato di riferimento. Incubare con le modalità previste dal metodo analitico e verificare la crescita di microrganismi con le caratteristiche morfologiche tipiche. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.

- Controllo della selettività del terreno. Verificare l'inibizione di crescita di un microrganismo opportunamente scelto. Strisciare sul terreno agarizzato o inoculare nel brodo un'ansata di brodocoltura allestita a partire da un ceppo puro certificato la cui crescita dovrebbe essere inibita nel substrato in esame. Incubare con le stesse modalità indicate dal metodo analitico e verificare l'assenza di crescita di colonie. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.

Per quanto riguarda i ceppi microbici di controllo per lo svolgimento delle prove di fertilità e selettività dei terreni colturali si rimanda alle indicazioni fornite dalle ditte produttrici.

Tutti i controlli effettuati dovranno essere accuratamente documentati, cioè registrati e archiviati.

Bibliografia

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th ed. Washington, DC: APHA; 2005.
2. ISO 7218/Amd.1. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations*. Geneva: International Organization for Standardization; 2001.
3. ISO Guide 30. *Terms and definitions used in connection with reference materials*. Geneva: International Organization for Standardization; 1992.
4. ISO Guide 31. *Reference materials - Contents of certificates and labels*. Geneva: International Organization for Standardization; 2000.
5. ISO Guide 32. *Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials*. Geneva: International Organization for Standardization; 1997.
6. ISO Guide 33. *Uses of certified reference materials*. Geneva: International Organization for Standardization; 2000.
7. ISO Guide 35. *Reference materials - General and statistical principles for certification*. Geneva: International Organization for Standardization; 2006.
8. Lightfoot NF, and Maier EA (Ed.). *Microbiological Analysis of Food and Water: Guidelines for Quality Assurance*. Amsterdam: Elsevier Science; 1998.
9. Niemelä SI. *Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms*. Helsinki: Mittatekniikan Keskus, Centre for Metrology and Accreditation, MIKES Publication J4; 2003.
10. UNI ENV ISO 13843. *Qualità dell'acqua - Guida per la validazione di metodi microbiologici*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.
11. UNI EN ISO 17994. *Qualità dell'acqua - Criteri per definire una equivalenza tra metodi microbiologici*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004.

MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

0. Generalità e definizioni

L'insieme dei procedimenti e delle operazioni che intercorrono tra il momento del prelievo del campione e lo svolgimento di un'analisi microbiologica rappresenta una delle fasi più delicate dell'intero procedimento analitico. I risultati analitici, e in particolare quelli microbiologici, infatti, devono permettere di stabilire le caratteristiche della matrice analizzata nelle condizioni in cui essa si trova nel momento in cui viene effettuato il prelievo. La fase pre-analitica, raccolta del campione, trasporto e sua conservazione, incide in misura non trascurabile sull'incertezza totale del risultato dell'analisi, diventando quindi strumento indispensabile per ottenere risultati analitici attendibili e affidabili.

La matrice acqua costituisce un elemento di relativa facile manipolazione a livello analitico, ma le sue caratteristiche chimico-fisiche-microbiologiche, specifiche per ogni tipologia, possono costituire fonte di instabilità quali-quantitativa dei suoi costituenti.

Una rilevanza particolare sugli esiti delle analisi microbiologiche è da attribuire alla disposizione e alla densità delle forme viventi in acqua. In condizioni ideali di omogeneità, la distribuzione dei microrganismi nell'acqua dovrebbe approssimarsi alla distribuzione di Poisson che, in realtà, si osserva generalmente solo a basse densità di organismi. Più spesso invece la distribuzione ha una varianza maggiore di quella attesa. Questa particolarità è dovuta alla tendenza all'aggregazione delle cellule microbiche che, non più omogeneamente distribuite, si vengono a trovare nell'acqua con una distribuzione spaziale anomala. Questa condizione, come anche l'adesione a materiale particolato può prolungare il tempo di sopravvivenza dei microrganismi nelle acque che è comunque anche influenzato dal loro stato di vitalità. Infatti, l'acqua, e quella disinfettata in particolare, rappresenta una matrice non favorevole alla sopravvivenza delle forme microbiche. Soprattutto le forme batteriche alloctone vengono a ritrovarsi in condizioni ambientali ostili e fattori fisico-chimici e biologici contribuiscono a ridurre le concentrazioni. Cellule batteriche sottoposte a condizioni di stress ambientale possono comunque sopravvivere e permanere a stadi diversi di vitalità, ma più spesso, pur restando metabolicamente attive, possono perdere la capacità di moltiplicarsi in condizioni standard di laboratorio, rimanendo quindi vitali ma diventando non coltivabili. A questo si aggiunge che batteri danneggiati possono non essere più in grado di esprimere le loro specifiche caratteristiche fenotipiche, condizionando quindi la risposta di analisi effettuate con i tradizionali metodi colturali. In tale condizione le cellule microbiche sono comunque in grado di sopravvivere per lungo tempo e, se inoculate in ospiti sensibili, potrebbero ancora essere in grado di indurre malattie.

Per individuare le caratteristiche di qualità di un'acqua e per seguire le sue variazioni temporali è innanzitutto necessario che i campioni da analizzare siano il più possibile rappresentativi delle reali condizioni qualitative e quantitative esistenti nella matrice. Campioni rappresentativi possono essere ricavati solo sulla base di piani di campionamento che prevedano obiettivi del prelievo, individuazione delle stazioni di prelievo, tempi e frequenze con cui debbono essere raccolti i campioni, come anche le modalità di manipolazione e conservazione dei campioni, gli eventuali parametri da determinare *in situ* e i criteri di valutazione e gestione dei dati. All'interno di un programma di controllo di qualità, è importante che ogni singolo fattore che potenzialmente ha influenza sul processo di campionamento e, di conseguenza, sul risultato finale sia identificato e coerentemente vengano adottate le misure di controllo più idonee.

1. Campo di applicazione

La procedura viene utilizzata per acque destinate o da destinare al consumo umano e fa riferimento alla norma ISO 19458.

2. Prelievo dei campioni

Il campionamento si svolge secondo una serie di procedure che permettono di raccogliere un'aliquota ridotta dell'acqua da sottoporre ad analisi. L'esecuzione dell'esame microbiologico delle acque destinate al consumo umano prevede che il prelievo dell'acqua da esaminare venga effettuato mediante un "campionamento istantaneo" che consiste nella raccolta di un unico campione in un'unica soluzione, in punti rappresentativi e in un tempo breve. Questo tipo di campionamento è distintivo soltanto delle condizioni contingenti presenti all'atto del prelievo.

Al momento del campionamento è necessario considerare con attenzione i volumi di acqua da prelevare. Essi vanno definiti in funzione dei parametri da determinare e comunque devono essere superiori al minimo necessario per procedere allo svolgimento degli esami richiesti.

Il prelievo dei campioni microbiologici deve essere effettuato con recipienti sterili, a perfetta tenuta, di materiale idoneo e utilizzati solo a questo scopo. In genere, contenitori di capacità di 500 mL sono sufficienti per l'analisi dei parametri indicatori. Di utilità sono le bottiglie di vetro borosilicato e di materiale plastico. Le bottiglie di vetro borosilicato devono comunque essere sterilizzate in condizioni controllate e usando integratori di controllo ad ogni ciclo, in laboratorio a calore secco (a circa 180 °C per 30 minuti o 160 °C per 2 ore) o a calore umido (a circa 121 °C per 20 minuti) e utilizzate entro tre mesi dalla sterilizzazione se conservate in condizioni ottimali. Le bottiglie monouso in materiale plastico, generalmente polietilene, già sterili, disponibili in commercio, hanno il vantaggio di essere leggere, resistenti alle variazioni termiche ed economiche; anche in questo caso è necessario attenersi alla data di scadenza indicata dal produttore. Per la raccolta di campioni da analizzare microbiologicamente non possono essere usati contenitori metallici.

Per la ricerca di patogeni (virus, parassiti), e quindi eventualmente per la necessità di prelevare grandi volumi di acqua (100-1000 L), spesso è opportuno effettuare il prelievo/concentrazione del campione *in situ*.

Pertanto, in funzione dell'esame da svolgere, è opportuno, preventivamente al prelievo, calcolare il volume occorrente allo svolgimento dell'analisi indicato in ciascuno dei metodi riportati nel presente manuale.

È di fondamentale importanza che durante le procedure di campionamento sia evitata qualsiasi contaminazione e alterazione della qualità del campione da esaminare.

Le acque destinate al consumo umano sono spesso disinfettate e contengono quindi tracce di cloro. Bottiglie/contenitori per i prelievi devono quindi contenere sodio tiosolfato in concentrazione idonea ad inibire l'azione del disinfettante. Ai valori di pH normalmente rilevabili delle acque potabili e con le concentrazioni di cloro generalmente in uso è sufficiente aggiungere una soluzione al 10% di sodio tiosolfato nella quantità di 0,1 mL per ogni 100 mL di capacità della bottiglia in grado di neutralizzare fino a 5 mg/L di cloro residuo libero e combinato. Poiché l'aggiunta, in bottiglie già sterilizzate, di una soluzione, se pure sterile, di neutralizzante può comportare il rischio di una contaminazione, è opportuno che la soluzione venga aggiunta prima della sterilizzazione dei contenitori. I tappi delle bottiglie devono essere poi ricoperti da fogli protettivi (in genere di alluminio) prima della sterilizzazione. La presenza di sodio tiosolfato, nelle quantità indicate, non interferisce con i risultati delle analisi microbiologiche. In commercio sono comunque disponibili bottiglie sterili già contenenti il sodio tiosolfato in concentrazione idonea.

Le bottiglie/contenitori utilizzati per prelevare campioni per analisi microbiologiche, non devono mai essere sciacquati all'atto del prelievo. Il risciacquo oltre ad esporre i recipienti a possibili contaminazioni, apporterebbe il sodio tiosolfato eventualmente presente.

Prelievi effettuati dai rubinetti per l'analisi di acque destinate al consumo umano devono essere effettuati secondo procedure che consentano di ottenere campioni rappresentativi. I rubinetti devono essere detersi e disinfettati prima del campionamento.

Eccezioni a questa pratica includono i casi in cui è necessario ottenere invece campioni per indagini epidemiologiche e che comunque devono fornire altri tipi di informazioni.

Il rubinetto e il collo al suo interno devono essere puliti e devono essere eliminati depositi, polvere, mucillagini, sostanze grasse, detersivi o agenti disinfettanti e altre sostanze che possono avere influenza sui risultati dell'analisi microbiologica.

Per la pulizia deve essere eseguita una disinfezione con una soluzione di sodio ipoclorito o analoghi disinfettanti: possono essere utilizzate soluzioni al 10% di sodio ipoclorito commerciale o di sodio dicloroisocianurato. Poiché hanno effetto corrosivo, le soluzioni vanno utilizzate dagli operatori con particolari cautele. Se vengono in contatto con la pelle, lavare al momento con molta acqua.

È opportuno disinfettare il rubinetto esternamente e internamente rimuovendo, se presenti, tubi di plastica e gomma. Depositati di grasso devono essere rimossi strofinando con 2-propanolo.

Una volta lavato il rubinetto con la soluzione disinfettante, lasciare agire il disinfettante per 2-3 minuti. Sciacquare quindi l'esterno con acqua per assicurarsi che non ci siano più residui di disinfettante. Aprire quindi il rubinetto e fare scorrere l'acqua per un tempo sufficiente a far sì che i disinfettanti vengano eliminati prima della raccolta del campione.

L'operazione di flambaggio del rubinetto, solo supplementare alla pulizia e disinfezione, comunque obbligatorie, può essere effettuata solo su rubinetti metallici. Tuttavia, se effettuata in modo superficiale e fugace, non esplica alcun effetto sulla eventuale contaminazione microbica presente. Volendo procedere al flambaggio, per la produzione della fiamma utilizzare gas propano o butano che permettono sia di raggiungere temperature più elevate, sia di controllare la fiamma, per evitare danni al personale e alle cose.

Eseguire il prelievo dopo avere fatto scorrere dal rubinetto l'acqua per 1-3 minuti evitando di modificare la portata del flusso durante la raccolta del campione.

All'atto del prelievo, aprire la bottiglia sterile avendo cura di non toccare la parte interna del tappo che andrà a contatto con il campione prelevato, né l'interno del collo della bottiglia e provvedere all'immediata chiusura della stessa subito dopo il prelievo, avendo cura di non riempirla completamente al fine di consentire una efficace omogeneizzazione del campione, in laboratorio, al momento dell'analisi.

Anche le apparecchiature eventualmente necessarie per il campionamento devono risultare sterili anche allo scopo di evitare fenomeni di contaminazione crociata. Se il prelievo viene effettuato per immersione, la bottiglia o il contenitore devono essere sterilizzati avvolti in fogli protettivi. All'atto del prelievo, dopo avere liberato dall'involucro la bottiglia, la superficie esterna che entrerà in contatto con il campione non deve mai essere toccata con le mani, bensì la bottiglia deve essere afferrata con una pinza sterile o con altro analogo idoneo sistema. L'apparecchiatura più semplice per lo svolgimento del campionamento istantaneo a profondità predeterminata è rappresentata da flaconi zavorrati che, immersi chiusi nella massa di acqua, si aprono a comando alla profondità prestabilita.

Il campione prelevato deve essere accompagnato da tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione, quali la data e l'ora del campionamento, il tipo di acqua, la precisa annotazione del punto in cui è stato effettuato il prelievo e devono altresì essere trasmesse, con il campione, tutte le indicazioni concernenti le eventuali determinazioni effettuate in loco e qualunque altra osservazione possa risultare utile nella interpretazione dei risultati di laboratorio. A parte ogni esigenza di natura giuridica, che può prevedere precise modalità di identificazione del campione, è comunque necessario che il campione venga contrassegnato sia con il codice numerico, sia con l'indicazione in chiaro del punto di campionamento.

3. Trasporto e conservazione dei campioni

Durante il trasporto e la conservazione di campioni di acqua per l'analisi microbiologica è necessario mantenere la rappresentatività del campione da analizzare e quindi prevenire il decadimento o la

ricrescita dei microrganismi presenti. Per quanto possibile, si devono quindi limitare alterazioni che sono spesso inevitabili in un'aliquota ridotta di acqua mantenuta in un contenitore chiuso.

Le alterazioni cui possono andare incontro campioni di acqua prelevati possono avere origine, non solo dalla condizione di spazio confinato in cui si ritrovano, ma anche da fattori fisici-chimico-biologici (composizione chimica dell'acqua, pH, azoto proteico, qualità e quantità della flora batterica presente, fenomeni di fagocitosi, ecc.) e dalla inosservanza dei tempi e/o delle modalità di trasporto.

Il campione deve essere protetto sia dalla luce (ultravioletta e visibile) sia dalle alte temperature e deve essere trasportato in laboratorio in idonee condizioni igieniche. Inoltre, durante il trasporto le bottiglie devono essere collocate nel contenitore in modo da impedire il loro rovesciamento e, fra esse devono essere collocati idonei sistemi di separazione per evitare rotture.

Tutti i campioni, dall'atto del prelievo sino all'arrivo in laboratorio, vanno conservati ad una temperatura inferiore a 10 °C; l'intervallo tra (2÷8) °C è quello consigliabile.

Al fine di consentire il mantenimento della temperatura, nel rispetto delle procedure di certificazione, consigliabile sarebbe l'uso di frigoriferi portatili a batteria con termocoppie registranti la temperatura; tuttavia, è almeno necessario usare contenitori termoisolanti che contengano piastre eutettiche, evitando comunque il congelamento del campione (ad eccezione di campioni in cui sono da ricercare virus).

Nonostante la necessità di mantenere la temperatura dei campioni di acqua nell'intervallo di valori consigliati, qualora le condizioni ambientali e quelle intrinseche del campione non lo consentano, si raccomanda di verificare che la temperatura di conservazione del campione non superi mai quella rilevata all'atto del prelievo.

Fermo restando che il tempo che intercorre tra prelievo e analisi dei campioni, indipendentemente dalla loro natura, deve essere il più breve possibile, nel caso di acque destinate al consumo umano, corre l'obbligo di non superare le 24 ore. Quando ciò non sia possibile, almeno per alcune indagini microbiologiche, sarebbe opportuno utilizzare idonei sistemi analitici portatili o laboratori mobili.

Bibliografia

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th ed. Washington DC: APHA; 2005.
2. Drinking Water Inspectorate. *The Microbiology of Drinking water*. London: DWI; 2002.
3. ISO 19458. *Water quality - Sampling for microbiological analysis*. Geneva: International Organization for Standardization; 2006.
4. Lightfoot NF and Maier EA (Ed.). *Microbiological Analysis of Food and Water: Guidelines for Quality Assurance*. Amsterdam: Elsevier Science; 1998.

DETERMINAZIONE DI *ESCHERICHIA COLI*

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Escherichia coli* rilevato con i metodi ISS A [001A rev. 00; 001B rev. 00; 001C rev. 00].

Escherichia coli è stato descritto per la prima volta nel 1885 da Theodor Escherich col nome di *Bacterium coli*. Il microrganismo, bastoncello gram-negativo, aerobio e anaerobio facoltativo, non sporigeno, fa parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed è inserito nel gruppo dei coliformi. Secondo la tradizionale classificazione, la specie produce indolo in terreni al triptofano ed è lattosio-fermentante distinguendosi dai coliformi non termotolleranti per la crescita alla temperatura di 44 °C. Nell'ambito del gruppo dei coliformi, *Escherichia coli* è ampiamente rappresentato ed è in esclusivo rapporto con il tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, a differenza dei microrganismi di origine non necessariamente fecale, appartenenti ai generi *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* e alle tante specie di coliformi psicrotrofi che si caratterizzano per uno spiccato potenziale di ricrescita una volta pervenuti nell'ambiente.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità da oltre un decennio ha riconosciuto la specie *E. coli* come indicatore primario di contaminazione fecale delle acque. Gli studi dell'US EPA hanno inoltre contribuito ad avvalorare la necessità di sostituire, per la valutazione della qualità delle acque, il parametro coliformi fecali con quello di *Escherichia coli*. La scelta, motivata dalla netta predominanza di *E. coli* rispetto agli altri coliformi nel materiale fecale e dalla minore sensibilità del microrganismo alle procedure di disinfezione rispetto alla maggior parte dei batteri patogeni enterici, è stata ormai accreditata da tutta la comunità scientifica internazionale. Tuttavia, i metodi più classici utilizzati per il suo rilevamento, inadeguati per laboriosità e lunghezza d'esecuzione, poiché non formulati per la sua selezione ma per il rilevamento dell'intero gruppo dei coliformi, comportano lunghi tempi per l'acquisizione della risposta. Oltre a ciò, come per i coliformi, è stata confermata l'ipotesi che parte dei biotipi di *E. coli* presenti nelle acque non sono in grado né di fermentare il lattosio, né di produrre gas nei tradizionali terreni di coltura. Inoltre, alcuni non sono né termotolleranti, né producono indolo in terreni contenenti triptofano. Diversamente, si è consolidata l'evidenza che un'alta percentuale di *E. coli*, intorno al 98%, e con l'eccezione dei sierotipi O157:H7, possiede l'enzima β -D-glucuronidasi.

Negli ultimi anni sono stati quindi formulati substrati, in numero sempre crescente, per la ricerca diretta di *Escherichia coli*, tutti basati, non più sulla tradizionale reazione della fermentazione del lattosio, bensì sul rilevamento dell'attività enzimatica della β -D-glucuronidasi, evidenziabile dall'idrolisi di β -glucuronidi cromogeni o fluorogeni con rilascio di composti colorati o fluorescenti. L'introduzione di metodi analitici che sfruttano questa specifica caratteristica, eliminando spesso la necessità di svolgere prove di conferma, permette di ottenere risultati in tempi più rapidi e di giungere con maggiore accuratezza alla determinazione del microrganismo ricercato.

Per i parametri microbiologici, a differenza dei parametri chimici, la Direttiva Europea 98/83/CE stabilisce metodi analitici di riferimento. Tuttavia, fornisce anche agli Stati Membri la possibilità di affiancare ai metodi di riferimento stabiliti nell'Allegato III, punto 1, metodi aggiuntivi, almeno equivalenti, da utilizzare in alternativa a quelli indicati dalla legge, individuati in conformità a specifiche procedure ed elaborazioni statistiche dei dati. In questo ambito, i risultati derivati dallo studio di confronto interlaboratorio organizzato dalla II Sottocommissione Metodi del Gruppo Metodi Microbiologici e Biologici dell'Istituto Superiore di Sanità, hanno dimostrato che, oltre al metodo indicato nell'Allegato III (ISO 9308-1), per il parametro *Escherichia coli*, può essere utilizzato, quale metodo ufficiale di riferimento, anche il sistema Colilert Quanti-Tray™.

Nelle acque destinate al consumo umano è prescritta l'assenza obbligatoria di *Escherichia coli* in relazione al suo ruolo di indicatore primario di contaminazione fecale. Il superamento del valore parametrico (*E. coli* 0 in 100 o 250 mL) costituisce una non conformità al valore stabilito dal DL.vo n. 31 del 2001 (Allegato I, parte A) e s.m.i.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS A [001A rev. 00; 001B rev. 00; 001C rev. 00] vengono utilizzate per la determinazione di *Escherichia coli* nelle acque da destinare e destinate al consumo umano, nelle acque di piscina e nelle acque trattate e nel dialisato standard quando trattasi di acque e soluzioni di dialisi.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo - ISS A 001A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Metodo MPN (*Most Probable Number*) a multi-pozzetto. Il metodo consente di determinare la concentrazione di *Escherichia coli* in un determinato volume di acqua. È applicabile all'analisi di acque poco o mediamente contaminate, anche disinfettate e di piscina, e comunque ad acque contenenti *Escherichia coli* danneggiati.

Il metodo permette di determinare simultaneamente e direttamente la concentrazione di *Escherichia coli* e di coliformi in campioni di acqua tramite una stima statistica calcolata in funzione del numero di pozzetti positivi e negativi ottenuti aggiungendo 100 mL di campione al substrato di crescita. Il risultato può essere ricavato dall'apposita tabella già predisposta (Tabella 1). Dopo un periodo di incubazione di circa 18 ore a (36 ± 1) °C si procede alla lettura dei risultati. *Escherichia coli*, idrolizzando il 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide, produce fluorescenza nei pozzetti gialli quando esposti ad una lampada a luce ultravioletta. Contemporaneamente, la presenza di coliformi viene evidenziata dalla colorazione gialla che appare nei pozzetti dovuta all'idrolisi dell'O-nitrofenil- β -D-galattopiranoside.

Il metodo è stato riportato dal Manuale *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, sotto il nome di *Enzyme Substrate Coliform Test*, dall'edizione del 1996. L'*Environmental Protection Agency* americana (US EPA) ha approvato il metodo e le sue successive modifiche sotto il nome di MMO-MUG test dal 1989. L'*Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) ha approvato il metodo con il nome di *Defined Substrate Technology* (Colilert) dal 1995. È riconosciuto per l'analisi delle acque potabili nella gran parte dei paesi dell'Unione Europea e in alcune decine di paesi nel mondo ed è riportato nel Manuale dei Metodi Analitici per le Acque del 2003.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice) sono necessari:

- Buste a multi-pozzetto Quanti-Tray™
- Comparatore di riferimento Quanti-Tray™
- Flaconi di plastica con antischiuma (100 mL) oppure flaconi in vetro con chiusura a vite di Schott sterilizzabili in autoclave, sterili
- Lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm
- Termosigillatrice automatica Quanti-Tray™

2.1.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare è pari 100 mL, sia che si tratti del campione tal quale, sia che si tratti di una sua diluizione, quest'ultima da determinare comunque in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare.

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Colilert Quanti-Tray™

Composizione	
Ammonio solfato	5 g
Manganese solfato	0,5 g
Zinco solfato	0,5 mg
Magnesio solfato	100 mg
Sodio cloruro	10 g
Calcio cloruro	50 g
Sodio solfito	40 g
Amfotericina B	1 mg
O-nitrofenil-β-D-galattopiranoside	0,5 g
4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide	75 mg
Solanium	0,5 g
Hepes buffer	
Sali di sodio	5,3 g
Acido organico	6,9 g

Il terreno si trova anche in commercio in fiale già preosate per l'esame di 100 mL di campione o di una sua diluizione. Il terreno, prodotto sotto forma granulare, si mantiene 24 mesi dalla data di produzione. Conservare le fiale a (4±25) °C.

Nell'esecuzione dell'analisi seguire le istruzioni della ditta produttrice e attenersi alle comuni norme di sicurezza previste per i laboratori di microbiologia.

Il prodotto è certificato come non tossico.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Miscelazione del campione

Aggiungere il terreno disidratato ad un volume di 100 mL del campione da analizzare. Miscelare con cura e, dopo che la polvere si è completamente sciolta, attendere qualche minuto. Versare la soluzione così ottenuta in una busta a multi-pozzetto Quanti-Tray™. Sigillare la busta inserendola nella termosigillatrice automatica Quanti - Tray™. La busta viene sigillata in 15 secondi.

Incubare a (36 ± 1) °C per 18 ore (fino a un massimo di 22 ore). Non sono richieste prove di conferma.

2.1.6. Interpretazione dei risultati

Dopo incubazione, contare il numero di pozzetti gialli che risultano fluorescenti quando esposti alla luce della lampada di Wood e calcolare il valore MPN facendo riferimento alla relativa Tabella 1.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *E. coli* NCTC 9001 o ATCC 25922 e come controllo negativo *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.7. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come MPN/100 mL; considerare l'eventuale diluizione qualora il campione non sia stato analizzato tal quale.

Nell'evenienza in cui non risultino pozzetti positivi (risultato ottenuto in base alla Tabella 1: <1/100 mL), l'analisi va considerata statisticamente equivalente ad un test di P/A (Presenza/Assenza). In questo caso riportare quindi il risultato come 0/100 mL.

È anche da considerare che, qualora si ottenga un valore non intero – caso questo non contemplato dalla legge – si ritiene comunque indispensabile approssimare all'unità il risultato, per difetto quando il valore della parte decimale sia ≤0,5, altrimenti per eccesso.

2.1.8. Caratteristiche di prestazione del metodo

La valutazione delle prestazioni del metodo, come parte di un programma di prove tra 4 laboratori, ha fornito i risultati di seguito riportati:

Sensibilità: 99%

Specificità: 98 %

Recupero (*E. coli* ATCC 25922): 108%

Escherichia coli: Ripetibilità = 0,000; Riproducibilità = 0,004

Intervalli di confidenza: corrispondenti a quelli calcolati sulla base della formula $MPN = N \times \ln N/N-X$ (dove N = numero totale di pozzetti e X = numero di pozzetti risultati positivi) della Tabella 1 ⁽¹⁾

La valutazione dell'equivalenza del metodo (ISO 17994), come parte di un programma di prove tra 9 laboratori, ha fornito i risultati di seguito riportati:

Normalità (Rankit plots - Wilk-Shapiro): 99%

N. colonie sottoposte a conferma 2145 (n % di z =95%); tasso di conferma 85%

Differenza media relativa minima significativa delle conte confermate rispetto a UNI EN ISO 9308-1:+8%.

Tabella 1. Tabella MPN Quanti-Tray® a 51 pozzetti

N. di pozzetti positivi in un campione da 100 mL	Numero più probabile	Intervallo di confidenza del 95% inferiore	Intervallo di confidenza del 95% superiore
0	< 1	0,0	3,7
1	1,0	0,3	5,6
2	2,0	0,6	7,3
3	3,1	1,1	9,0
4	4,2	1,7	10,7
5	5,3	2,3	12,3
6	6,4	3,0	13,9
7	7,5	3,7	15,5
8	8,7	4,5	17,1
9	9,9	5,3	18,8
10	11,1	6,1	20,5
11	12,4	7,0	22,1
12	13,7	7,9	23,9
13	15,0	8,8	25,7
14	16,4	9,8	27,5
15	17,8	10,8	29,4
16	19,2	11,9	31,3
17	20,7	13,0	33,3
18	22,2	14,1	35,2
19	23,8	15,3	37,3
20	25,4	16,5	39,4
21	27,1	17,7	41,6
22	28,8	19,0	43,9
23	30,6	20,4	46,3
24	32,4	21,8	48,7
25	34,4	23,3	51,2
26	36,4	24,7	53,9
27	38,4	26,4	56,6
28	40,6	28,0	59,5
29	42,9	29,7	62,5
30	45,3	31,5	65,6
31	47,8	33,4	69,0
32	50,4	35,4	72,5
33	53,1	37,5	76,2
34	56,0	39,7	80,1
35	59,1	42,0	84,4

segue

⁽¹⁾ Niemelä SI. *Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms*. Helsinki: Mittatekniikan Keskus, Centre for Metrology and Accreditation, MIKES Publication J4; 2003.

continua

N. di pozzetti positivi in un campione da 100 mL	Numero più probabile	Intervallo di confidenza del 95% inferiore	Intervallo di confidenza del 95% superiore
36	62,4	44,6	88,8
37	65,9	47,2	93,7
38	69,7	50,0	99,0
39	73,8	53,1	104,8
40	78,2	56,4	111,2
41	83,1	59,9	118,3
42	88,5	63,9	126,2
43	94,5	68,2	135,4
44	101,3	73,1	146,0
45	109,1	78,6	158,7
46	118,4	85,0	174,5
47	129,8	92,7	195,0
48	144,5	102,3	224,1
49	165,2	115,2	272,2
50	200,5	135,8	387,6
51	> 200,5	146,1	infinito

2.2. Metodo - ISS A 001B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana – Prova normalizzata. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri appartenenti alla specie *Escherichia coli* che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione alla temperatura di $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per (18÷24) ore, contare le colonie tipiche (*E. coli* presuntivi) e sottoporle a conferma per la verifica dell'appartenenza alla specie.

Il metodo fa riferimento alla norma UNI EN ISO 9308-1:2002.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice).

2.2.3 Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 100 mL (250 mL per l'acqua imbottigliata), è comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.2.4. Terreni di coltura e reagenti

2.2.4.1. Terreno di base agarizzato al lattosio TTC con eptadecilsolfato di sodio

Composizione		
Lattosio	20	g
Peptone	10	g
Estratto di lievito	6	g
Estratto di carne	5	g
Blu di bromotimolo	0,05	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH	7,2±0,1	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per 15 min. A 1 L di terreno, aggiungere sterilmente 50 mL di soluzione di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) (2.2.4.2.) e 50 mL di soluzione di eptadecilsolfato di sodio (Tergitol 7) (2.2.4.3.), miscelando con cura. In alcune formulazioni il terreno ha già tra i suoi componenti il Tergitol 7; in

tal caso aggiungere solamente 50 mL di soluzione di TTC. È preferibile preparare il terreno al momento dell'uso e comunque, una volta preparato, mantenerlo al riparo dalla luce. Conservare il terreno a (5 ± 3) °C per non più di 10 giorni in condizioni ottimali.

2.2.4.2. Soluzione di TTC

Composizione		
2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC)	0,05	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere il TTC in acqua distillata e portare al volume di 100 mL. Sterilizzare per filtrazione attraverso una membrana con pori di dimensioni nominali pari a 0,2 µm.

2.2.4.3. Soluzione di eptadecilsolfato di sodio

Composizione		
Eptadecilsolfato di sodio (Tergitol 7)	0,2	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere il Tergitol 7 in acqua distillata e portare al volume di 100 mL. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti.

2.2.4.4. Terreno completo

Composizione		
Terreno di base (2.2.4.1.)	1000	mL
Sol. TTC (2.2.4.2.)	50	mL
Sol. di eptadecilsolfato di sodio (2.2.4.3.)	50	mL

Sciogliere il terreno di base e far raffreddare a (50 ± 5) °C. Rispettando le comuni regole di asepsi, aggiungere la soluzione di TTC e quella di Tergitol 7 (se non già nel terreno di base) e miscelare con cura evitando la formazione di bolle. Distribuire in capsule di Petri con uno spessore di almeno 5 mm e lasciare solidificare. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di 10 giorni in condizioni ottimali.

2.2.4.5. Agar soia triptone

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

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 min. Distribuire in capsule di Petri con uno spessore di almeno 5 mm e lasciare solidificare. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

2.2.4.6. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Composizione		
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. È da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa.

2.2.4.7. Brodo al triptofano

Composizione		
Digerito triptico di caseina	10	g
L-triptofano	1	g
Cloruro di sodio	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,5±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, distribuire in tubi in ragione di 3 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 min. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

2.2.4.8. Reattivo di Kovacs

Composizione		
<i>p</i> -dimetilaminobenzaldeide	5	g
Alcool amilico o butilico	75	mL
Acido cloridrico ($\rho = 1,18$ g/mL)	25	mL

Sciogliere l'aldeide nell'alcool e aggiungere l'acido concentrato.

Utilizzare preferibilmente i prodotti disponibili in commercio per evitare la manipolazione durante la preparazione.

Il prodotto è classificato come preparato pericoloso secondo i criteri descritti nelle Direttive 67/548/CEE (sostanze pericolose) e 1999/45/CE (preparati pericolosi) e nei loro aggiornamenti. È nocivo per inalazione e infiammabile.

Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria, protezione degli occhi e delle mani, protezione della pelle.

Conservare il reattivo, che deve essere di colore dal giallo chiaro al marrone chiaro, a riparo dalla luce diretta a (5 ± 3) °C.

2.2.5. Procedura**2.2.5.1. Filtrazione**

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45 μ m (pori simmetrici da 0,45 μ m oppure pori asimmetrici da 0,7/0,2 μ m). Porre la membrana sulla superficie del terreno agarizzato al lattosio TTC con eptadecilsolfato di sodio (2.2.4.4.) e procedere all'incubazione a (36 ± 1) °C per (18÷24) ore (fino ad un massimo di 48 ore). Per avere indicazioni sulla presenza di eventuale flora interferente è possibile, in aggiunta, filtrare un identico volume di campione su un'altra membrana da porre sulla superficie del terreno al lattosio TTC con eptadecilsolfato di sodio (2.2.4.4.) procedendo poi all'incubazione a $(43 \div 44)$ °C con la tolleranza di (± 1) °C per (18÷24) ore (fino ad un massimo di 48 ore).

2.2.5.2. Interpretazione dei risultati

Dopo incubazione contare tutte le colonie che, cresciute a (36 ± 1) °C, mostrano lo sviluppo di una colorazione gialla nel terreno sotto la membrana (*E. coli* presuntivi). Considerare solamente come orientativa la lettura delle colonie cresciute a 44 °C anche in relazione alla eventuale presenza di *E. coli* non termotolleranti.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *E. coli* ATCC 25922 e come controllo negativo *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

2.2.5.3. Prove di conferma

Per la verifica dell'appartenenza alla specie *Escherichia coli* è d'obbligo effettuare la verifica della presenza dell'enzima citocromossidasi e della produzione di indolo su, preferibilmente, tutte o su un numero comunque rappresentativo di colonie tipiche.

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 soia triptone (2.2.4.5.) incubando a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(18 \div 24)$ ore. Eseguire la prova su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.2.5.4. Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. *Escherichia coli* è citocromossidasi-negativo.

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Agar soia triptone (2.2.4.5.) e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.2.4.6.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. Una reazione negativa (tipica di *E. coli*) si manifesta con mancato sviluppo di colore, mentre i microrganismi citocromossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.

2.2.5.5. Prova della produzione di indolo

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile le colonie sospette cresciute sul terreno Agar soia triptone (2.2.4.5.). Inoculare in tubi contenenti brodo al triptofano (2.2.4.7.) e incubare a $(43 \div 44) ^\circ\text{C}$ con la tolleranza di $(\pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(18 \div 24)$ ore.

Dopo incubazione aggiungere alla brodocoltura alcune gocce di reattivo di Kovacs (2.2.4.8.). Una reazione positiva si manifesta entro pochi secondi con lo sviluppo di una colorazione rossa ad anello all'interfaccia. *Escherichia coli* è generalmente indolo-positivo, come anche *Klebsiella oxytoca*, come possono esserlo anche alcuni stipiti di *Citrobacter freundii*, *C. koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia fergusonii*.

2.2.6. Interpretazione dei risultati

Le colonie tipiche risultate citocromossidasi-negative e indolo-positive, o che l'identificazione biochimica ha confermato come tali, sono *E. coli* confermati.

2.2.7. Espressione dei risultati

La concentrazione di *E. coli* si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma, considerando l'eventuale diluizione e riportando il valore come numero per 100 mL di campione (N./100 mL).

Qualora si tratti di acque imbottigliate considerare come volume di riferimento 250 mL.

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

dove

C	numero di colonie che sono state confermate per 100 mL
A	numero di colonie confermate
B	numero di colonie sottoposte a conferma
N	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
V_t	volume di campione analizzato (in mL)
V_s	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
F	fattore di diluizione

2.2.8. Caratteristiche di prestazione del metodo

Nell'ambito di un programma di prove tra 9 laboratori per la valutazione dell'equivalenza di metodi (ISO 17994), sono stati ottenuti i risultati di seguito riportati:

N °Colonie sottoposte a conferma 5185 (n % di z =81%); tasso di conferma 32%.

2.3. Metodo - ISS A 001C rev. 00

2.3.1. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana – Prova rapida. Il metodo viene riportato nella norma UNI EN ISO 9308-1:2002 che stabilisce che lo svolgimento della prova può essere effettuato solamente se in parallelo con la prova normalizzata (Metodo ISS A 001B rev. 00).

La procedura, da eseguire in singolo o in doppio strato, e comunque in parallelo con la prova normalizzata, prevede un'incubazione della membrana, prima alla temperatura di (36 ± 1) °C per $(4 \div 5)$ ore, poi alla temperatura di $(43 \div 44)$ °C con la tolleranza di (± 1) °C per $(19 \div 20)$ ore. Sottoporre successivamente le colonie di *E. coli* presuntivi a conferma.

2.3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice).

2.3.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 100 mL (250 mL per l'acqua imbottigliata), è comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.3.4. Terreni di coltura e reagenti

2.3.4.1. Agar soia triptone

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

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a (121 ± 3) °C per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

Il terreno, prima della sterilizzazione, può altrimenti essere distribuito e mantenuto in tubi per lo svolgimento della prova con il doppio strato. Le piastre a doppio strato devono essere preparate al momento dell'uso.

2.3.4.2. Agar bile triptone

Composizione	
Triptone	20 g
Sali di bile	1,5 g
Agar	20 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,2±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 min.

Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

2.3.4.3. Reattivo per la verifica della produzione di indolo

Composizione		
p-dimetilaminobenzaldeide	0,5	g
Acido cloridrico c(HCl)= 1 mol/L	100	mL

Sciogliere la p-dimetilaminobenzaldeide in acido cloridrico. Utilizzare preferibilmente i prodotti disponibili in commercio. L'uso del preparato, classificato come irritante, richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria, protezione degli occhi e delle mani, protezione della pelle.

Conservare il reattivo, che deve essere di colore giallo chiaro, a riparo dalla luce a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

2.3.5. Procedura

2.3.5.1. Filtrazione

Procedendo in parallelo con il Metodo 2 (2.2.), filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa 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 $0,7/0,2 \mu\text{m}$). Porre la membrana sulla superficie del terreno Agar soia triptone (2.3.4.1.) e procedere all'incubazione a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(4 \div 5)$ ore. Quindi, rispettando le dovute regole di asepsi, trasferire la membrana sul terreno Agar bile triptone (2.3.4.2.) e procedere all'incubazione a $(43 \div 44) ^\circ\text{C}$ con la tolleranza di $(\pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(19 \div 20)$ ore. In alternativa, ma comunque in parallelo con il Metodo 2 (2.2.), filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa e porre la membrana sulla superficie del terreno Agar bile triptone (2.3.4.2.) su cui sono stati versati, a coprire, alcuni millilitri di Agar soia triptone (2.3.4.1.). Procedere prima all'incubazione a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(4 \div 5)$ ore, poi a $(43 \div 44) ^\circ\text{C}$ con la tolleranza di $(\pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(19 \div 20)$ ore.

2.3.5.2. Prova di conferma per la produzione di indolo

Per la verifica dell'appartenenza alla specie *Escherichia coli* è d'obbligo effettuare la verifica della produzione di indolo.

Entrambe le procedure, a singolo e doppio strato, richiedono, alla fine del periodo di incubazione, il trasferimento della membrana da saggiare su un dischetto imbevuto del reattivo (2.3.4.3.). Entro alcuni minuti, lo sviluppo di un alone rosso intorno alle colonie fornisce una reazione positiva. *Escherichia coli* è generalmente indolo-positivo, come anche *Klebsiella oxytoca*, come possono esserlo anche alcuni stipiti di *Citrobacter freundii*, *C. koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia fergusonii*.

L'esecuzione della prova così come descritta dalla norma UNI EN ISO 9308-1:2002 è sconsigliata quando sono presenti troppe colonie sulla membrana. Infatti, l'eventuale diffusione della colorazione rossa su tutta la membrana può causare interferenze tra colonie contigue e quindi comportare difficoltà nell'interpretazione dei risultati.

2.3.6. Interpretazione dei risultati

Le colonie tipiche indolo-positive sono da considerare *E. coli* confermati.

2.3.7. Espressione dei risultati

La concentrazione di *E. coli* si calcola confrontando i risultati ottenuti dall'analisi effettuata in parallelo con la prova normalizzata (Metodo 2). Il numero di *E. coli* è quindi pari al numero di colonie confermate che è risultato più alto comparando i conteggi ottenuti con i due metodi (Metodo 2 e Metodo 3).

Bibliografia

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th, ed. Washington, DC: APHA; 2005.
2. APAT/IRSA-CNR. *Metodi Analitici per le Acque*. 29/2003. Roma: APAT/IRSA-CNR; 2003.
3. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of AOAC*. 16th ed.; 1995.
4. Briancesco R, Coccia AM, Della Libera S, Semproni M e Bonadonna L. Nuovi orientamenti normativi per il controllo delle acque: la ricerca di *Escherichia coli*. *Ig Sanità Pubbl* 2000;LVI: 85-94.
5. ISO 17994. *Water quality - Criteria for establishing equivalence between microbiological methods*. Geneva: International Organization for Standardization; 2004.
6. Niemelä SI. *Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms*. Helsinki: Mittatekniikan Keskus, Centre for Metrology and Accreditation, MIKES Publication J4; 2003.
7. UNI EN ISO 9308-1. *Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione di Escherichia coli e batteri coliformi - Metodo di filtrazione su membrana*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.
8. UNI ENV ISO 13843. *Qualità dell'acqua - Guida per la validazione di metodi microbiologici*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.

DETERMINAZIONE DEGLI ENTEROCOCCHI

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Enterococchi rilevato con il metodo ISS A 002 A rev. 00.

Sebbene Bartram e Rees considerino i termini streptococchi fecali, enterococchi, enterococchi intestinali e gruppo *Enterococcus* sinonimi nel caso delle specie rilevabili nell'ambiente, l'ordinamento tassonomico del gruppo di microrganismi che venivano compresi sotto l'unica definizione di streptococchi fecali, negli ultimi anni, è stato soggetto ad ampia revisione. Gli studi più recenti hanno distinto, infatti, sulla base di caratteristiche fisiologiche e di tecniche di ibridizzazione del DNA, tre generi diversi di cui due - *Enterococcus* e *Streptococcus* - comprenderebbero specie intestinali o di sicura origine fecale.

Gli enterococchi sono cocchi gram positivi, catalasi negativi, si presentano isolati, doppi o più frequentemente a catena e sono provvisti dell'antigene D. Il genere comprende 17 specie determinate sulla base delle sequenze della subunità 16S dell'rRNA che hanno permesso di individuare la presenza di specie di gruppo. Le specie appartenenti al genere *Enterococcus*, che vengono definite in grado di ridurre il 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro a formazano e di idrolizzare l'esculina a 44 °C, soddisfano specifici requisiti: crescita a 10 °C e 45 °C, resistenza a 60 °C per 30 minuti, crescita a pH 9,6 e al 6,5% di NaCl, idrolisi del 4-metilumbelliferil- β -D-glucoside in presenza di tallio acetato, acido nalidixico e 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro. Gruppi diversi sono stati individuati in questo genere e comprendono le specie *Ent. faecium*, *Ent. durans*, *Ent. hirae*, *Ent. mundtii* (primo gruppo); *Ent. avium*, *Ent. pseudoavium*, *Ent. raffinosus* e *Ent. malodoratus* (secondo gruppo); *Ent. casseliflavus* e *Ent. gallinarum* (terzo gruppo). *Ent. faecalis*, *Ent. cecorum*, *Ent. colombae* e *Ent. saccharolyticus*, che hanno tra loro una bassa similarità genotipica, sono stati inseriti in un quarto gruppo. L'appartenenza al genere *Enterococcus* di specie diverse anche dal punto di vista molecolare comporta difficoltà nell'individuare test fenotipici capaci di identificare il genere. Anche il test già comunemente utilizzato per una conferma dell'appartenenza al gruppo, l'idrolisi dell'esculina, se ancora utile ad individuare anche le nuove specie del genere *Enterococcus*, fornisce comunque reazione positiva anche per microrganismi appartenenti ai generi *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* e *Leuconostoc*. Secondo la nuova tassonomia, nel genere *Streptococcus* si individuano gli streptococchi orali, gran parte dei quali opportunisti patogeni e poco adattabili alla sopravvivenza nell'intestino e gli streptococchi di prevalente derivazione animale con habitat intestinale (streptococchi intestinali). Le specie che vengono comprese in quest'ultimo sottogruppo (*Strep. bovis*, *Strept. equinus*, *Strep. alactolyticus*, *Strep. suis*, *Strep. intestinalis*, *Strep. hyointestinalis*) hanno caratteristiche diverse dal punto di vista genotipico e differente significato sanitario. La loro proporzione è diversa nelle feci delle diverse specie animali e comunque sempre prevalente rispetto alla loro concentrazione nelle feci umane. Tuttavia, se queste differenze avevano precedentemente consentito di avanzare l'ipotesi di ottenere indicazioni sulla origine fecale dell'inquinamento, anche sulla base del rapporto tra i due indicatori, coliformi e streptococchi, è stato verificato che la valutazione del rapporto tra gli indicatori, per stabilire l'origine della contaminazione, può portare a conclusioni e interpretazioni errate. Infatti, è stato calcolato che, a causa della diversa capacità di sopravvivenza nelle acque da parte dei microrganismi considerati e della maggiore resistenza all'azione dei disinfettanti da parte del gruppo degli enterococchi/streptococchi, la proporzione numerica tra i due gruppi di indicatori è comunque alterata.

La presenza di enterococchi nelle acque destinate al consumo umano è segnalata raramente. Evenienze di questo tipo sono comunque da mettere in relazione a sicura contaminazione di origine fecale, spesso dovuta ad infiltrazioni dall'esterno o a fenomeni di *cross-connection*. Inoltre, gli enterococchi nelle acque in distribuzione sono un segnale della ridotta efficienza del sistema di trattamento delle acque.

Negli ultimi anni sono stati formulati metodi rapidi per la ricerca dei microrganismi appartenenti al genere *Enterococcus* basati su attività enzimatiche specifiche e che non necessitano dello svolgimento di prove di conferma. I metodi più classici sono comunque da ritenersi ancora validi anche se tuttora comportano lo svolgimento di prove aggiuntive per l'accertamento dell'appartenenza al genere.

Nelle acque destinate al consumo umano è prescritta l'assenza obbligatoria degli enterococchi in relazione al loro ruolo di indicatori di contaminazione fecale. Il superamento del valore parametrico (Enterococchi 0 in 100 o 250 mL) costituisce una non conformità al valore stabilito dal DL.vo n. 31 del 2001 (Allegato I, parte A) e s.m.i.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica ISS A 002 A rev. 00 viene utilizzata per la determinazione degli enterococchi nelle acque da destinare e destinate al consumo umano, nelle acque di piscina e nelle acque trattate e nel dialisato standard quando trattasi di acque e soluzioni di dialisi.

2. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri appartenenti al genere *Enterococcus* che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione alla temperatura di $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(40 \div 48)$ ore, contare le colonie tipiche (enterococchi presuntivi) e sottoporle a conferma tramite la verifica dell'idrolisi dell'esculina.

Il metodo fa riferimento alla norma UNI EN ISO 7899-2:2003.

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice).

4. Terreni di coltura e reagenti

4.1. Substrato di isolamento

4.1.1. Terreno di base di Slanetz e Bartley

Composizione		
Triptosio	20	g
Estratto di lievito	5	g
Destrosio	2	g
Dipotassio idrogeno fosfato	4	g
Sodio azide	0,4	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata. Sciogliere il terreno in acqua distillata secondo le istruzioni della ditta produttrice. A 1 L di terreno, aggiungere sterilmente 10 mL di soluzione di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) (4.1.2.), miscelando con cura. Non sterilizzare. In alcune formulazioni il terreno ha già tra i suoi componenti il TTC.

Il terreno è classificato come Xn - Nocivo. È pericoloso per inalazione. La scheda di sicurezza, a cui è necessario fare riferimento, informa che l'azide sodica, presente nel terreno, può avere effetti irritanti

per gli occhi e per la pelle. Durante la manipolazione e lo smaltimento è necessario adottare particolari precauzioni: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

4.1.2. Soluzione di trifeniltetrazolio cloruro

Composizione		
2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro	1	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere il trifeniltetrazolio cloruro nell'acqua distillata. Sterilizzare per filtrazione (porosità nominale di 0,2 µm). Proteggere la soluzione dalla luce ed eliminare nel caso in cui si sviluppi una colorazione rosa.

4.1.3. Terreno completo di Slanetz e Bartley

Composizione		
Terreno di base (4.1.1.)	1000	mL
2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (4.1.2.)	10	mL
pH 7,2±0,2		

Aggiungere 10 mL di soluzione di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro ad 1 L di terreno di base mantenuto a (50 ± 5) °C. Nel caso sia necessario correggere il pH, utilizzare una soluzione di sodio carbonato (100 g/L) o di sodio idrossido (40 g/L) o di acido cloridrico (36,5 g/L). Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5 ± 3) °C al riparo dalla luce per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e come controllo negativo *E. coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

4.2. Terreno per la prova di conferma

4.2.1. Terreno all'Esculina-bile-azide Agar

Composizione		
Triptone	17	g
Peptone	3	g
Estratto di lievito	5	g
Bile di bue	10	g
Esculina	1	g
Ferro (III) ammonio citrato	0,5	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio azide	0,15	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,1±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, 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 2 settimane in condizioni ottimali.

5. Procedura

5.1. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 100 mL per le acque in distribuzione e a 250 mL per le acque imbottigliate, è comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

5.2. Filtrazione e incubazione

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa 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). Porre la membrana sulla superficie del terreno di Slanetz e Bartley (4.1.3.) e procedere all'incubazione a (36 ± 1) °C per $(40 \div 48)$ ore.

5.3. Identificazione e conteggio delle colonie

Sono considerate come tipiche le colonie di colore dal rosa al rosso scuro e marrone (al centro o su tutta la colonia).

6. Conferma

6.1. Prova dell'idrolisi dell'esculina

In presenza di colonie tipiche, trasferire la membrana sul terreno all'Esculina bile azide agar (4.2.1.) pre-riscaldato a 44 °C. Incubare a (44 ± 1) °C per 2 ore. Dopo incubazione si considerano positive le colonie in corrispondenza delle quali, sul retro della membrana, sul terreno all'esculina compare un alone nero-marrone. È possibile prolungare l'incubazione oltre le 2 ore, in quanto alcuni stipiti si sono dimostrati lenti a idrolizzare che l'esculina.

7. Espressione dei risultati

La concentrazione di enterococchi si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma, considerando l'eventuale diluizione e riportando il valore come numero per 100 mL di campione ($N / 100$ mL).

Qualora si tratti di acque imbottigliate considerare come volume di riferimento 250 mL.

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati della prova di conferma, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

dove

<i>C</i>	numero di colonie che sono state confermate per 100 mL
<i>A</i>	numero di colonie confermate
<i>B</i>	numero di colonie sottoposte a conferma
<i>N</i>	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
<i>V_t</i>	volume di campione analizzato (in mL)
<i>V_s</i>	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
<i>F</i>	fattore di diluizione

8. Caratteristiche di prestazione del metodo

La valutazione delle prestazioni del metodo, come parte di una serie di prove intralaboratorio (UNI ENV ISO 13843), ha fornito i risultati di seguito riportati:

Specificità: tasso falsi positivi: 10%; tasso falsi negativi: 12%

Recupero (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212): 81%

Precisione, come massima deviazione standard relativa: 21%.

Bibliografia

1. APAT/IRSA-CNR. *Metodi Analitici per le Acque. 29/2003*. Roma: APAT/IRSA-CNR; 2003.
2. Bartram J and Rees G (Ed.). *Monitoring bathing waters*. London and New York: E & FN Spon; 2003.
3. Leclerc H, Devriese LA, and Mossel DAA. Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J Appl Bacteriol* 1996;81:459-66.
4. UNI EN ISO 7899-2. *Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione degli enterococchi intestinali – Parte 2. Metodo di filtrazione su membrana*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.

DETERMINAZIONE DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Pseudomonas aeruginosa* rilevato con il metodo ISS A 003A rev. 00.

I microrganismi appartenenti alla specie *Pseudomonas aeruginosa* sono batteri a forma di bastoncino diritto o leggermente ricurvo, con lunghezza di $1,5\pm 3\ \mu\text{m}$ e larghezza compresa tra $0,5$ e $0,7\ \mu\text{m}$, motili tramite uno o più flagelli polari, Gram negativi, aerobi, citocromossidasi e catalasi positivi, capaci di produrre ammonio da acetamide, con metabolismo respiratorio ma in grado anche di utilizzare i nitrati come accettori di elettroni alternativi all'ossigeno. La maggioranza dei ceppi cresce a 42°C ma non a 4°C . *Ps. aeruginosa* si caratterizza per la produzione di pigmenti: piocianina, prodotta solo da *Ps. aeruginosa*, solubile in acqua, di colore verde-blu, piorubina, insolubile in acqua, di colore rossastro-marrone e fluoresceina o pioverdina, solubile in acqua, di colore dal giallo-verde al giallo-bruno e fluorescente all'ultravioletto. Più del 90% dei ceppi produce piocianina e un rapporto inversamente proporzionale sembra esistere tra i tassi di crescita e la produzione di piocianina; infatti, a decrementi del tasso di crescita corrisponderebbero incrementi nella produzione di questo pigmento.

Pseudomonas aeruginosa è un microrganismo caratterizzato da una elevata capacità di adattamento. Si rileva in acque superficiali, reflue e marine, suoli, vegetazione e in generale, in tutti gli ambienti umidi. Inoltre, è in grado di crescere in acqua distillata e di sopravvivere nei disinfettanti. Si moltiplica facilmente, raggiungendo concentrazioni elevate, anche nelle acque oligotrofe dove la sua presenza è comunque difficilmente correlabile a quella degli indicatori di contaminazione fecale. Rappresenta uno dei microrganismi tipici dei biofilm. Infatti, è in grado di aderire a superfici umide o in contatto con liquidi grazie alla produzione, da parte di ceppi mucoidi o non mucoidi, di lipopolisaccaridi e glicoproteine extracellulari. È un microrganismo prettamente ambientale e per questo rilevabile anche in acque sotterranee e in acque potabili dove può essere riscontrato in concentrazioni ampiamente variabili. In particolare, è facilmente rilevabile in condizioni di stagnamento di acqua ed è in grado di installarsi nei serbatoi, nei rompigitto dei rubinetti e nelle apparecchiature ad uso domestico per il trattamento di acque potabili, raggiungendo cariche batteriche elevate. Generalmente, nelle acque clorate *Ps. aeruginosa* viene evidenziato quando la concentrazione di cloro residuo è inferiore a $1\ \text{mg/L}$. La sua presenza è di norma considerata indice di cattiva procedura di confezionamento delle acque messe in vendita in bottiglia o in contenitori dove, se presente, è in grado di moltiplicarsi. In acque minerali imbottigliate il gruppo delle pseudomonadacee, incluso *Ps. aeruginosa*, risulta essere il gruppo microbico dominante. *Pseudomonas aeruginosa* si caratterizza anche per essere multi-resistente agli antibiotici, rappresentando quindi un rischio per la salute in ambienti ospedalieri dove può provocare infezioni delle vie urinarie, delle ustioni e delle ferite, ulcere corneali e cheratiti, setticemie, gastroenteriti nei neonati, ascessi, broncopolmoniti e meningiti. La sua attività patogena è dovuta alla sua capacità invasiva e alla produzione di sostanze extracellulari, quali alcune proteasi, tossine emolitiche, enterotossine e la tossina letale, esotossina A. In aree ad elevata frequenza di infezioni nosocomiali (es. cardiocirurgia), può essere responsabile del 14,5% del totale delle infezioni. Risulta quindi essere un tipico patogeno opportunista.

Gli studi più recenti hanno comunque messo in evidenza che non esistono evidenze epidemiologiche che permettano di correlare la presenza di *Ps. aeruginosa* nelle acque potabili con malattie di natura gastroenterica nella popolazione sana, anche per l'alta dose infettante richiesta per produrre la malattia, 10^9 organismi nei soggetti immunocompetenti. Spesso quindi le infezioni causate da *Ps. aeruginosa* vengono correlate prevalentemente a contatto con acqua contaminata, e sono quindi segnalate in associazione a frequentazione di piscine e uso di soluzioni per lenti a contatto. In questi casi, il microrganismo è quindi considerato responsabile di infezioni cutanee, otiti e infezioni oculari. Negli ultimi anni sono stati formulati metodi rapidi per la ricerca della specie *Pseudomonas aeruginosa* basati sulla presenza dell'enzima amino-peptidasi che non necessitano dello svolgimento di prove di conferma. I metodi più classici hanno alcuni limiti legati soprattutto dalla necessità di

svolgere elaborate e lunghe prove addizionali per l'accertamento dell'appartenenza al genere, con conseguente allungamento dei tempi di risposta delle analisi.

La ricerca di *Ps. aeruginosa* nelle acque destinate al consumo umano in distribuzione ha una rilevanza legata prevalentemente alla verifica dell'efficacia del trattamento a cui sono soggette le acque. Il parametro è inserito tra quelli indicati nell'Avvertenza dell'Allegato I del DL.vo n. 31 del 2001 e successive modifiche e integrazioni e va interpretato quindi come indicatore di qualità delle acque potabili in rete. Diversamente, il suo inserimento nella Parte A dell'Allegato I dello stesso decreto impone lo svolgimento di controlli del grado di protezione dell'acqua dall'ambiente esterno durante il confezionamento di acque imbottigliate anche per la verifica del mantenimento di condizioni di buona qualità dell'acqua durante la conservazione. In questo caso, come patogeno opportunisto in grado di moltiplicarsi in condizioni statiche dell'acqua, *Ps. aeruginosa* deve essere obbligatoriamente assente nelle acque destinate al consumo umano messe in vendita in bottiglia o in contenitori.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica ISS A 003A rev. 00 viene utilizzata per la determinazione di *Pseudomonas aeruginosa* nelle acque da destinare e destinate al consumo umano, nelle acque di piscina e nelle acque trattate e nel dialisato standard quando trattasi di acque e soluzioni di dialisi.

2. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri appartenenti alla specie *Pseudomonas aeruginosa* che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione alla temperatura di (36 ± 1) °C per (40-48) ore, contare le colonie tipiche e sottoporle a conferma: colonie che producono piocianina sono considerate confermate; colonie fluorescenti o marrone-rossastro richiedono conferma. Il metodo fa riferimento alla norma UNI EN 12780:2002.

3. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice) è necessario avere a disposizione una lampada di Wood con lunghezza d'onda di 360 ± 20 nm.

4. Terreni di coltura e reagenti

4.1. Terreno di isolamento

4.1.1. Terreno di base *Pseudomonas* agar/CN

Composizione		
Peptone gelatina	16	g
Caseina idrolisata	10	g
Solfato di potassio anidro	10	g
Cloruro di magnesio anidro	1,4	g
Glicerolo	10	mL
Agar	11-18	g
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata secondo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 min. Raffreddare a (50 ± 5) °C. Aggiungere il supplemento (4.1.2.).

4.1.2. Supplemento CN

Composizione	
Cetrimide (cetiltrimetilammonio bromuro)	0,2 g
Acido nalidixico	15 mg

Il supplemento è disponibile in commercio. Ricostituire in 2 mL di acqua distillata sterile. Aggiungere il supplemento asetticamente a 1 L di terreno di base (4.1.1.) raffreddato e mescolare.

Il prodotto è classificato come T - Tossico per la presenza di acido nalidixico. È pericoloso per contatto, inalazione e ingestione. La scheda di sicurezza, a cui è necessario fare riferimento, informa che il prodotto potrebbe avere effetti cancerogeni (R45) e causare danni genetici (R46). Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

4.1.3. Terreno completo *Pseudomonas* agar/CN

Composizione	
Terreno di base <i>Pseudomonas</i> agar/CN	1000 mL
Supplemento CN	2 mL
pH 7,1±0,2	

Aggiungere ad 1 L di terreno di base (4.1.1.) 2 mL di supplemento (4.1.2.). Agitare per ottenere una soluzione omogenea e, rispettando le comuni regole di asepsi, distribuire in capsule di Petri. Non mantenere fuso il terreno per più di 4 ore.

Conservare a (5 ± 3) °C a riparo dalla luce per non più di un mese in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 o NCTC 10332 e come controllo negativo *E. coli* ATCC 25922 o NCTC 9001; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

4.2. Terreni di conferma

4.2.1. Terreno B di base di King

Composizione	
Peptone	20 g
Dipotassio idrogeno fosfato	1,5 g
Magnesio solfato eptaidrato	1,5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata secondo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Aggiungere glicerolo (4.2.2.).

4.2.2. Glicerolo

4.2.3. Terreno B completo di King

Composizione	
Terreno B di base di King (4.2.1.)	1000 mL
Glicerolo (4.2.2.)	10 mL
pH 7,2±0,2	

Aggiungere a 1 L di terreno di base (4.2.1.) 10 mL di glicerolo (4.2.2.). Agitare per ottenere una soluzione omogenea e, rispettando le comuni regole di asepsi, distribuire in tubi in ragione di 5 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 min. Conservare a (5 ± 3) °C a riparo dalla luce per non più di tre mesi in condizioni ottimali.

Per controlli di produttività è consigliabile utilizzare *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14207; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

4.2.4. Brodo all'acetamide – Soluzione A

Composizione	
Potassio di idrogenofosfato	1 g
Magnesio solfato anidro	0,2 g
Acetamide	2 g
Sodio cloruro	0,2 g
Acqua distillata	900 mL
pH 7,0±0,5	

Sciogliere gli ingredienti in acqua distillata.

La soluzione è tossica per la presenza di acetamide. Il prodotto potrebbe avere effetti cancerogeni (R45) e mutageni. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

Evitare il contatto con sostanze infiammabili, acidi e basi forti.

4.2.5. Brodo all'acetamide – Soluzione B

Composizione	
Sodio molibdato	0,5 g
Ferro solfato	0,05 g
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere gli ingredienti in acqua distillata.

4.2.6. Brodo all'acetamide – Soluzione completa

Composizione	
Soluzione A (4.2.4.)	900 mL
Soluzione B (4.2.5.)	1 mL
Acqua distillata	

Aggiungere a 900 mL di soluzione A (4.2.4.) 1 mL di soluzione B (4.2.5.) e portare a volume di 1 L con acqua distillata mescolando continuamente. Distribuire in tubi in ragione di 5 mL/tubo e sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 min. Conservare a (5 ± 3) °C a riparo dalla luce per non più di tre mesi in condizioni ottimali.

4.2.7. Agar Nutritivo

Composizione	
Estratto di carne	1 g
Peptone	5 g
Estratto di lievito	2 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,4±0,2	

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

Conservare a riparo dalla luce a (5 ± 3) °C per non più di un mese in condizioni ottimali.

4.3. Reagenti

4.3.1. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Composizione	
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. È da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa.

4.3.2. Reattivo di Nessler

Composizione	
Cloruro di mercurio	10 g
Potassio ioduro	7 g
Idrossido di sodio	16 g
Acqua distillata	

La soluzione è anche disponibile in commercio; in alternativa sciogliere il cloruro di mercurio e lo ioduro di potassio in un volume ridotto di acqua distillata. Mescolando, aggiungere lentamente la soluzione all'idrossido di sodio disciolto in 50 mL di acqua distillata. Portare a volume di 100 mL. Conservare in bottiglie di vetro borosilicato con tappo di gomma a riparo dalla luce per non più di un anno.

La soluzione è tossica per la presenza di cloruro di mercurio. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

5. Procedura

5.1. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 250 mL o 100 mL, è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

5.2. Filtrazione e incubazione

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa 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). Porre la membrana sulla superficie del terreno di isolamento (4.1.3.) e procedere all'incubazione a (36 ± 1) °C per (40÷48) ore.

5.3. Identificazione delle colonie

Verificare dopo (22÷2) ore e dopo (44÷4) ore la crescita di colonie tipiche sul terreno di isolamento (4.1.3.). *Ps. aeruginosa* può sviluppare colonie di colore verde-blu che producono piocianina, fluorescenti e marrone-rossastro.

Contare tutte le colonie di colore verde-blu e considerarle come colonie confermate di *Ps. aeruginosa*. Sottoporre a conferma le colonie risultate fluorescenti (*Ps. aeruginosa* presuntivo) alla lampada di Wood, procedendo alla verifica della produzione di ammonio da acetamide, e quelle che hanno prodotto un pigmento di colore marrone-rossastro (*Ps. aeruginosa* presuntivo), procedendo all'esecuzione delle prove relative alla produzione di ammonio da acetamide, alla verifica della presenza della citocromossidasi, alla produzione di fluorescenza. Circa il 10% dei biotipi di *Ps. aeruginosa* non produce pigmento.

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.

6. Conferma

Secondo la norma UNI EN 12780, per la verifica dell'appartenenza alla specie *Pseudomonas aeruginosa* delle colonie risultate fluorescenti alla lampada di Wood è necessario procedere allo svolgimento di una prova di conferma per la verifica della produzione di ammonio da acetamide.

Come prove aggiuntive opzionali, è consigliabile verificare la presenza dell'enzima citocromossidasi e la crescita a 42°C.

Analogamente, per le colonie di colore marrone-rossastro che non fluorescono (presuntive) è necessario procedere allo svolgimento delle seguenti prove di conferma: verifica della produzione di ammonio da acetamide, verifica della presenza della citocromossidasi, crescita sul terreno B di King con produzione di fluorescenza alla lampada di Wood. Anche in questo caso, è consigliabile verificare la crescita a 42°C.

È possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio.

Prima di effettuare ciascuna prova di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare, preferibilmente, tutte o comunque un numero rappresentativo di colonie sospette su Agar Nutritivo (4.2.7.) incubando a (36 ± 1) °C per (22÷2) ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

6.1. Verifica della produzione di ammonio

Sottoporre alla verifica della produzione di ammonio le colonie fluorescenti e quelle che hanno prodotto un pigmento marrone-rossastro.

Inoculare ciascuna colonia sospetta cresciuta su Agar Nutritivo (4.2.7.) in un tubo contenente il Brodo all'acetamide (4.2.6.) e incubare a (36 ± 1) °C per (22÷2) ore. Dopo incubazione aggiungere 1-2 gocce di Reattivo di Nessler (4.3.2.) e verificare la produzione di ammonio che si manifesta con una colorazione compresa tra il giallo e il rosso-mattone.

Le colonie risultate sia fluorescenti sul terreno di isolamento (4.1.3.) sia positive per la produzione di ammonio sono confermate come *Ps. aeruginosa*.

Procedere alle successive prove di conferma per le colonie con pigmento marrone-rossastro e positive per la produzione di ammonio.

6.2. Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti alla specie *Ps. aeruginosa* in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. Prelevare dall'Agar Nutritivo (4.2.7.), seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile le colonie che, in primo isolamento, avevano prodotto un pigmento marrone-rossastro e strisciarle su una carta da filtro imbibita del reattivo (4.3.1.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. I microrganismi citocromossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi. Una reazione negativa si manifesta con il mancato sviluppo di colore.

Ps. aeruginosa è citocromossidasi-positivo come anche le altre specie di *Pseudomonas*.

6.3. Verifica della produzione di fluorescenza

Seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, prelevare dall'Agar Nutritivo (4.2.7.) le colonie che, in primo isolamento, avevano prodotto un pigmento marrone-rossastro e che sono risultate citocromossidasi-positive e isolarle sul terreno B di King.

Incubare fino a 5 giorni a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$, sebbene l'eventuale positività della prova sia, generalmente, già evidenziabile dopo 24 ore di incubazione.

Dopo incubazione, osservare, con la lampada di Wood, la produzione di fluorescenza e registrare come positive per *Ps. aeruginosa* tutte le colonie fluorescenti.

Le colonie con pigmento marrone-rossastro in primo isolamento, citocromossidasi-positive e fluorescenti sul terreno B di King sono da considerarsi confermate come *Ps. aeruginosa*.

6.4. Prova della crescita a 42°C

Prova opzionale. Prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta, strisciarla su Agar Nutritivo (4.2.7.) e incubare a $(41 \div 43) ^\circ\text{C}$ per $(48 \div 2)$ ore. I microrganismi appartenenti alla specie *Pseudomonas aeruginosa* sono in grado di crescere a questa temperatura di incubazione; pertanto, il risultato è positivo quando si ha lo sviluppo della colonia.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10332, ATCC 14207 o ATCC 9027 e come controllo negativo *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

7. Espressione dei risultati

Dal numero di colonie tipiche contate sulla membrana, e tenendo conto delle colonie confermate, calcolare il numero di *Pseudomonas aeruginosa* presenti in uno specifico volume di campione.

Esprimere i risultati in funzione del volume di riferimento specifico per la tipologia di acqua analizzata, considerando, ad esempio, che per le acque destinate al consumo umano messe in vendita in bottiglie o contenitori e per quelle in distribuzione, il numero di *Pseudomonas aeruginosa* deve essere riportato come numero per 250 mL (N. /250 mL); per le acque destinate al consumo umano in distribuzione è, in alternativa, possibile esprimere il risultato come *Pseudomonas aeruginosa* Presente o Assente/250 mL; per le acque di piscina il valore deve essere riferito a 100 mL.

Calcolare il numero di microrganismi presenti secondo la seguente formula:

$$C = [P + F (cF/nF) + R (cR/nR)] \times \frac{V_i \times F}{V_s}$$

dove

<i>C</i>	numero di colonie confermate in 100 mL o 250 mL
<i>P</i>	numero di colonie verde-blu
<i>F</i>	numero di colonie fluorescenti
<i>R</i>	numero di colonie marrone-rossastro
<i>cF</i>	numero di colonie fluorescenti risultate positive per la produzione di ammonio
<i>nF</i>	numero di colonie fluorescenti saggiate per la produzione di ammonio
<i>cR</i>	numero di colonie marrone-rossastro risultate positive per la produzione di ammonio, la citocromossidasi e la fluorescenza sul terreno B di King
<i>nR</i>	numero di colonie numero di colonie marrone-rossastro saggiate per la produzione di ammonio, la citocromossidasi e la fluorescenza sul terreno B di King
V_t	volume di campione analizzato (in mL)
V_s	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 o 250 mL)
<i>F</i>	fattore di diluizione

8. Caratteristiche di prestazione del metodo

La valutazione delle prestazioni del metodo senza l'esecuzione della prova opzionale 6.4, come parte di una serie di prove intralaboratorio (UNI ENV ISO 13843), ha fornito i risultati di seguito riportati:

Tasso falsi positivi: 64%; tasso falsi negativi: 0%

Specificità (colonie verdi tipiche): 98%

Specificità (colonie fluorescenti tipiche): 23%

Recupero (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027): 15%

Precisione, come massima deviazione standard relativa: 12%

Bibliografia

1. Allen M, Edberg S, and Reasoner D. Heterotrophic plate count (HPC) bacteria – What is their significance in drinking water? In: *Proceedings of the NFS International/WHO Symposium on Bacteria in drinking water. Public health implications?* Geneva, 24-27 aprile 2002. Geneva: OMS; 2003. p. 29-33.
2. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, Wood WB, McCarty M. *Trattato di Microbiologia*. Padova: Piccin Editore; 1981.
3. UNI EN 12780. *Qualità dell'acqua - Ricerca e conteggio di Pseudomonas aeruginosa attraverso la filtrazione su membrana*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.

CONTEGGIO DELLE COLONIE SU AGAR A 22 °C E 37 °C

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Conteggio delle colonie su agar a 22 °C e 37 °C rilevato con il metodo ISS A 004A rev. 00.

Il Conteggio delle colonie su agar è un parametro che permette di rilevare un gruppo eterogeneo di microrganismi aerobi che hanno differenti capacità metaboliche e richieste nutrizionali. L'uso di temperature diverse permette di mettere in evidenza microrganismi mesofili (a 37 °C) e psicrofili (a 22 °C). Molti di essi possono appartenere alla microflora ambientale autoctona delle acque, presente indipendentemente da qualsiasi contaminazione. Il parametro non ha rilevanza sanitaria.

Infatti, negli ultimi anni, il ruolo svolto nelle acque destinate al consumo umano dal gruppo di microrganismi indicati dagli anglosassoni sotto il nome di *Heterotrophic Plate Count* (HPC) (conteggio degli eterotrofi) e corrispondente al termine Conteggio delle colonie su agar, è stato approfondito e riconsiderato. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha riconosciuto che gran parte degli studi epidemiologici più recenti, volti alla verifica del rischio associato alla presenza di questi microrganismi nelle acque, ha confermato che non esistono evidenze che dimostrino che, in assenza di contaminazione fecale, i risultati ottenuti dalla determinazione dell'HPC siano correlati con i rischi per la salute nella popolazione sana. Inoltre, è stato più volte sottolineato che i metodi analitici utilizzati per la determinazione del parametro si limitano a rilevare microrganismi vitali e non sono in grado di evidenziare o segnalare patogeni eventualmente presenti nell'acqua.

Recentemente, sono stati sviluppati metodi rapidi anche per la determinazione di questo parametro.

Nella Direttiva Europea 98/83/CE sulle acque destinate al consumo umano e nel conseguente DL.vo n. 31 del 2001, il parametro è riportato nella Parte A e nella Parte C (parametri indicatori) dell'Allegato I.

Se per le acque imbottigliate (Parte A) sono stabiliti valori di parametro (Conteggio a 22 °C: 100/mL; Conteggio a 37 °C: 20/mL), alla concentrazione degli eterotrofi rilevabili nelle acque in distribuzione (Parte C) non è stato assegnato alcun valore limite. La normativa stabilisce infatti che i valori del conteggio delle colonie a 22 °C nelle acque in rete debbano presentarsi "senza variazioni anomale", accettando quindi la possibilità che ogni tipo di acqua abbia comunque intrinseche caratteristiche di qualità e una flora microbica naturale. Tuttavia, il superamento delle concentrazioni "storicamente" rilevate nell'acqua in distribuzione può segnalare la potenziale esistenza di condizioni di ricrescita batterica in rete e modifiche della qualità dell'acqua. Il parametro va considerato indicatore di qualità e di efficienza di trattamento. Variazioni di concentrazione sono tollerate fermo restando quanto stabilito nell'art. 14 del decreto e possono, in questo caso, essere segnalate come "inosservanza" del valore di parametro.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica A 004A rev. 00 viene utilizzata per la determinazione di microrganismi aerobi coltivabili a 22 °C e 37 °C nelle acque da destinare e destinate al consumo umano, nelle acque di piscina e nelle acque trattate e nel dialisato standard quando trattasi di acque e soluzioni di dialisi.

2. Principio del metodo

La procedura analitica permette di contare le colonie di tutti i microrganismi (batteri, lieviti e funghi) cresciuti nella compagine del terreno agarizzato (tecnica dell'inclusione in agar) analizzando aliquote note di campione miscelate con il substrato mantenuto fuso e lasciato successivamente solidificare in capsule di Petri. Di seguito si fa riferimento al metodo UNI EN ISO 6222:2001.

L'uso di questa metodica è previsto anche per l'analisi di acque in rete, acque trattate e nel dialisato standard quando trattasi di acque e soluzioni di dialisi. Tuttavia, il metodo non è sufficientemente sensibile per definire ultrapuri le acque e i dialisati per i quali è più opportuno utilizzare la tecnica della filtrazione su membrana analizzando 50-100 mL di campione e incubando a temperatura ambiente.

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice).

4. Terreni di coltura e reagenti

4.1. Substrato di isolamento

4.1.1. Agar all'estratto di lievito

Composizione	
Estratto di lievito	3 g
Triptone	6 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,2±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. Distribuire in tubi in ragione di circa 15 mL/tubo e sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

5. Procedura

5.1. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 1 mL, è comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare. Il metodo generalmente non consente di analizzare volumi superiori a 2 mL.

5.2. Semina del campione e incubazione

La procedura di analisi per l'enumerazione dei microrganismi a 37 °C e a 22 °C è la stessa per entrambi i parametri.

Tecnica dell'inclusione in agar. Seminare sul fondo di capsule di Petri vuote aliquote non superiori a 2 mL del campione o di una sua diluizione. Versare, nelle capsule contenenti l'inoculo, circa 15 mL di

substrato di isolamento (4.1.1.) mantenuto liquefatto alla temperatura di $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ rispettando le comuni regole di asepsi. Non superare i 15 minuti di intervallo tra il momento dell'inoculo in capsula e l'aggiunta del terreno colturale. Non mantenere il terreno in fusione in bagnomaria oltre le 4 ore.

Mescolare accuratamente ruotando in un verso e nell'altro le capsule per permettere una completa miscelazione tra il terreno colturale e il campione. Lasciare solidificare e porre ad incubare una capsula a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per (40÷48) ore e l'altra a $(22 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per (64÷72) ore.

Quando trattasi di acque e soluzioni di dialisi, per l'analisi di acque in rete, acque trattate e dialisato standard incubare per (5 ÷ 7) giorni a $(20 \div 23) ^\circ\text{C}$. Per definire "ultrapuri" le acque e i dialisati è opportuno utilizzare la tecnica della filtrazione su membrana (porosità nominale $0,22 \mu\text{m} - 0,45 \mu\text{m}$) analizzando 50-100 mL di campione e incubando per (5 ÷ 7) giorni a $(20 \div 23) ^\circ\text{C}$.

5.3. Conteggio e interpretazione dei risultati

Dopo il periodo di incubazione, per ciascuna temperatura di crescita, contare tutte le colonie con idoneo sistema di ingrandimento su fondo scuro e scartare le piastre con crescita confluyente.

6. Espressione dei risultati

Esprimere i risultati come numero per millilitro (N. /mL) di campione per ciascuna temperatura di incubazione considerando l'eventuale diluizione effettuata.

Se, nelle piastre inoculate, non sono cresciute colonie, esprimere il risultato come "non rilevato"/mL. Se sono presenti più di 300 colonie, esprimere il risultato come $> 300/\text{mL}$.

Bibliografia

1. Allen M, Edberg S and Reasoner D. Heterotrophic plate count (HPC) bacteria – What is their significance in drinking water? In: *Proceedings of the NFS International/WHO Symposium on Bacteria in drinking water. Public health implications?* Geneva 24-27 aprile 2002. Geneva: OMS; 2003. p. 34-41.
2. Linee guida per il controllo delle acque per emodialisi. *Giornale Italiano di Nefrologia* 2005;3:246-73.
3. UNI EN ISO 6222. *Qualità dell'acqua - Valutazione quantitativa dei microrganismi vitali. Conteggio delle colonie per inoculo su terreno agarizzato*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2001.

DETERMINAZIONE DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Clostridium perfringens* rilevato con i metodi ISS A [005A rev. 00; 005B rev. 00].

Il genere *Clostridium* fu riconosciuto da Prazmowski nel 1880. I microrganismi appartenenti al genere sono bacilli Gram-positivi (talora debolmente Gram-positivi o anche Gram-negativi). I clostridi riducono il solfito con produzione di solfuri e producono spore termoresistenti e stabili nell'ambiente, generalmente a localizzazione terminale o subterminale. In particolare, *Clostridium perfringens* produce colonie caratteristiche a 44°C su terreni contenenti solfito, non è motile, riduce i nitrati a nitriti, fermenta il lattosio e liquefa la gelatina in circa 48 ore. Il genere è molto eterogeneo riguardo all'ossigeno; si ritrovano, infatti, vicino a specie moderatamente aerotolleranti (*Cl. aerotolerans*, *Cl. histolyticum*, ecc.), specie anaerobiche obbligate, (*Cl. perfringens*, *Cl. haemolyticum*, ecc.) che mancano del sistema dei citocromi e di catalasi, e producono ATP esclusivamente mediante reazioni di fosforilazione a livello del substrato. La temperatura è un parametro discriminante per i clostridi: ad esempio, alcuni ceppi di *Cl. perfringens* sono molto sensibili all'azione del calore, mentre altri lo sono meno. Molti ceppi di *Cl. perfringens* crescono a 44°C e questa caratteristica può essere sfruttata per migliorare la specificità e il recupero del microrganismo nei campioni ambientali.

La maggior parte dei clostridi sono normalmente saprofiti e vivono negli strati superficiali del suolo e nei sedimenti, alcune specie vivono nell'intestino di alcuni animali, compreso l'uomo e alcune sono patogene.

Clostridium perfringens è anaerobio obbligato, la verifica dell'assenza dell'enzima catalasi è una delle prove biochimiche utili per distinguerlo dalle diverse specie appartenenti al genere *Bacillus*. È presente sia nelle feci umane, in concentrazioni variabili tra 10^2 e 10^7 UFC/g (Unità Formanti Colonia per grammo), sia in quelle canine e suine ed è meno comune o addirittura assente nelle feci degli altri animali a sangue caldo. Nei reflui le concentrazioni del microrganismo possono raggiungere valori intorno a 10^5 UFC/100 mL e la riduzione delle sue concentrazioni, durante i trattamenti di depurazione delle acque, può raggiungere il 95-98%. Nelle acque destinate al consumo umano la presenza di *Clostridium perfringens* è raramente segnalata. I suoi livelli di concentrazione sono comunque ampiamente eterogenei, variando da <1 UFC/100 mL in acque non contaminate, a valori superiori a 3000 UFC/100 mL in acque contaminate da effluenti fognari.

Clostridium perfringens, nonostante l'elevata dose infettante, può essere responsabile della gangrena gassosa, di setticemie e di gravi tossinfezioni alimentari. È noto, comunque che ceppi tossigeni e non tossigeni presentano capacità diverse di resistenza alla temperatura di 100°C, con una minore capacità di sopravvivenza da parte dei ceppi tossigeni.

Al momento attuale, per la sua maggiore resistenza nell'ambiente, la determinazione di *Cl. perfringens* è considerata un buon supplemento per la valutazione della qualità di matrici ambientali, soprattutto se con caratteristiche particolari, quali acque clorate, acque non trattate che contengono scarichi industriali letali per i microrganismi non sporigeni e acque reflue. Molta cautela, comunque, deve essere posta nel trarre conclusioni dalla sua presenza nell'ambiente. Nelle acque destinate al consumo umano il parametro può fornire informazioni sia circa la qualità organolettica e microbiologica delle acque, sia circa l'efficienza del trattamento subito dalle acque.

Il DL.vo 31/2001 e s.m.i. stabilisce che il parametro *Cl. perfringens* (spore comprese) sia da determinare solo quando le acque derivino o siano influenzate da acque superficiali. Inoltre, nella nota 2 dell'Allegato I, parte C è stabilito che, in caso di non osservanza del valore parametrico fissato (0 organismi/100 mL), sia necessario verificare che non sussistano rischi per la salute dei consumatori derivanti dalla presenza di patogeni quali, ad esempio, *Cryptosporidium*.

La normativa riporta un metodo analitico per la ricerca di *Cl. perfringens* che fornisce risultati variabili e bassi valori di recupero del microrganismo. Nel 2005, l'Health Protection Agency (HPA) ha proposto l'uso di un metodo alternativo come metodo nazionale in Gran Bretagna. Pertanto, di

seguito, oltre al metodo indicato nel DL.vo 31/2001, verrà descritto anche il metodo previsto come standard dall'HPA. Entrambe le procedure contemplano, nell'esecuzione, l'analisi del campione di acqua tal quale, senza preventivo pre-trattamento termico.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS A [005A rev. 00; 005B rev. 00] di seguito descritte vengono utilizzate per la determinazione di *Clostridium perfringens* nelle acque da destinare e destinate al consumo umano.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo - ISS A 005A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di microrganismi della specie *Cl. perfringens* che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione a $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (21 ± 3) ore in condizioni anaerobiche, si contano le colonie tipiche (*Cl. perfringens* presuntivo) e si sottopongono a conferma mediante esposizione a vapori di idrossido di ammonio (*Cl. perfringens* confermato).

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice), per lo svolgimento dell'analisi, è necessario avere a disposizione una giara con accessori per la produzione di condizioni anaerobiche.

2.1.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare è almeno di 100 mL e comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Terreno di base m-CP agar

Composizione		
Triptosio	15	g
Estratto di lievito	10	g
Saccarosio	2,5	g
Cloridrato di L-cisteina	0,5	g
Magnesio solfato eptaidrato	0,05	g
Bromocresolo porpora	20	mg
Agar	7,5	g
Acqua distillata	500	mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere in 500 mL di acqua distillata, sterilizzare a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Raffreddare a $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$ e aggiungere i supplementi. È consigliabile preparare il terreno in piccoli volumi per evitarne la conservazione e l'uso posticipato. Tuttavia, qualora il terreno non venga subito utilizzato, conservarlo a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di 5 giorni senza l'aggiunta dei supplementi.

2.1.4.2. Soluzione alla polimixina-cicloserina

Composizione		
Polimixina B-solfato	105,000	U.I.
D-cicloserina	200	mg
Acqua distillata sterile	2	mL

Dopo avere sciolto i componenti in 2 mL di acqua distillata sterile, aggiungere asetticamente la soluzione a 500 mL di terreno di base m-CP agar (2.1.4.1) raffreddato a (50 ± 5) °C. Qualora si utilizzi il supplemento disponibile in commercio, preparare seguendo accuratamente le istruzioni della ditta produttrice.

2.1.4.3. Soluzione di Indosil β -D glucoside allo 0,75%

Composizione		
Indosil β -D glucoside	30	mg
Acqua distillata sterile	4	mL

Dopo avere sciolto il componente in 4 mL di acqua distillata sterile, aggiungere asetticamente la soluzione a 500 mL di terreno di base m-CP agar (2.1.4.1) raffreddato a (50 ± 5) °C.

2.1.4.4. Soluzione di difosfato di fenoltaleina allo 0,5%

Composizione		
Difosfato di fenoltaleina	0,25	mg
Acqua distillata sterile	10	mL

Dopo avere sciolto il componente in 10 mL di acqua distillata sterile, aggiungere asetticamente la soluzione a 500 mL di terreno di base m-CP agar (2.1.4.1) raffreddato a (50 ± 5) °C.

2.1.4.5. Soluzione di ferro cloruro esaidrato al 4,5%

Composizione		
Ferro cloruro esaidrato	0,45	g
Acqua distillata sterile	10	mL

Dopo avere sciolto il componente in 10 mL di acqua distillata sterile, aggiungere asetticamente 1 mL della soluzione a 500 mL di terreno di base m-CP agar (2.1.4.1.) raffreddato a (50 ± 5) °C.

2.1.4.6. Terreno completo m-CP agar

Composizione	
Terreno di base (2.1.4.1.)	500 mL
Sol. alla polimixina-cicloserina (2.1.4.2.)	2 mL
Sol. di Indosil β -D glucoside (2.1.4.3.)	4 mL
Sol. di fenoltaleina difosfato (2.1.4.4.)	10 mL
Sol. di ferro cloruro esaidrato (2.1.4.5.)	1 mL
pH 7,6 \pm 0,2	

Miscelare accuratamente gli ingredienti e distribuire in capsule di Petri. È preferibile utilizzare il terreno immediatamente ed evitarne la conservazione e l'uso posticipato. Procedere all'esecuzione di controlli di qualità del terreno al momento dell'uso.

2.1.4.7. Soluzione di Idrossido di ammonio

2.1.5 Procedura

2.1.5.1. Filtrazione su membrana

Filtrare almeno 100 mL di campione attraverso una membrana di acetato di cellulosa con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori di 0,45 µm (pori simmetrici da 0,45 µm o pori asimmetrici da 0,7/0,2 µm) rispettando le comuni norme di asepsi.

Trasferire sterilmente la membrana in una capsula di Petri contenente il terreno m-CP agar addizionato dei supplementi, evitando la formazione di bolle d'aria tra la membrana e la superficie del terreno agarizzato. Incubare alla temperatura di (44 ± 1) °C per (21 ± 3) ore in condizioni anaerobie.

2.1.6. Lettura dei risultati

I microrganismi appartenenti alla specie *Cl. perfringens* formano colonie giallo-opaco sul terreno m-CP agar. Contare le colonie tipiche e considerarle come *Cl. perfringens* presuntivo.

2.1.7. Prove di conferma

Procedere alla conferma delle colonie gialle opache (*Cl. perfringens* presuntivo) mediante esposizione del terreno per (20÷30) secondi a vapori di idrossido di ammonio (2.1.4.7.).

È possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio.

2.1.8. Interpretazione dei risultati

Contare come *Cl. perfringens* le colonie che, cresciute su m-CP agar, diventano rosa o rosse dopo esposizione a vapori di idrossido di ammonio.

2.1.9. Espressione dei risultati

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati della prova di conferma, o che l'identificazione biochimica ha dimostrato appartenere alla specie, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

dove

<i>C</i>	numero di colonie che sono state confermate per 100 mL
<i>A</i>	numero di colonie confermate
<i>B</i>	numero di colonie da sottoporre a conferma
<i>N</i>	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
<i>V_t</i>	volume di campione analizzato
<i>V_s</i>	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
<i>F</i>	eventuale fattore di diluizione

2.2. Metodo - ISS A 005B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Il metodo fa riferimento al National Standard Method W 5 Issue 3 dell'Health Protection Agency.

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di microrganismi della specie *Cl. perfringens* che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione in condizioni anaerobie a (44 ± 1) °C per (21 ± 3) ore, si contano le colonie tipiche (*Cl. perfringens* presuntivo) e si sottopongono a conferma.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice), per lo svolgimento dell'analisi, è necessario avere a disposizione una giara con accessori per la produzione di condizioni anaerobie.

2.2.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare è almeno di 100 mL e comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.2.4. Terreni di coltura e reagenti

2.2.4.1 Terreno di base: *Triptosio Solfito Cicloserina Agar*

Composizione	
Triptosio	15 g
Soia peptone	5 g
Estratto di lievito	5 g
Sodio metabisolfito	1 g
Ferro ammonio citrato	1 g
Agar	12 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Preparare il terreno preferibilmente al momento dell'uso. Dopo avere sciolto la polvere in 1 L di acqua distillata, sterilizzare a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Lasciare raffreddare e aggiungere una soluzione di D-cicloserina.

2.2.4.2. Soluzione di D-cicloserina

Composizione	
D-cicloserina	4 g
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere la D-cicloserina in acqua distillata e sterilizzare per filtrazione su una membrana con pori di porosità nominale di $0,2 \mu\text{m}$. Conservare la soluzione a $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali. Il supplemento è anche disponibile in commercio in fiale già pronte per l'uso.

2.2.4.3. Terreno completo al *Triptosio Solfito Cicloserina Agar*

Composizione	
Terreno di base (2.2.4.1.)	1000 mL
Soluzione di cicloserina (2.2.4.2.)	10 mL
pH $7,6 \pm 0,2$	

Sciogliere il terreno di base (2.2.4.1.) e far raffreddare a $(50 \pm 5) ^\circ\text{C}$. Rispettando le comuni regole di asepsi, aggiungere 10 mL di soluzione di D-cicloserina a 1 L di terreno. Miscelare con cura evitando la formazione di bolle. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare.

Se si utilizzano le fiale di D-cicloserina disponibili in commercio, procedere secondo le istruzioni della ditta produttrice.

È opportuno preparare il terreno al momento dell'uso. Eventualmente, conservare a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$, preferibilmente in condizioni anaerobie, per non più di 7 giorni in condizioni ottimali. Prove di laboratorio hanno messo in evidenza che la resa del terreno è ampiamente influenzata dal tempo e dalle condizioni di conservazione; pertanto il tempo di conservazione del terreno completo, in condizioni refrigerate, non dovrebbe superare le 48 ore.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Cl. perfringens* NCTC 8237 e come controllo negativo *E. coli* NCTC 9001; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

2.2.4.4. Terreno al nitrato e per la motilità

Composizione		
Estratto di carne	3	g
Peptone	5	g
Nitrato di potassio	1	g
D-galattosio	5	g
Glicerolo	5	g
Disodio idrogeno fosfato	2,5	g
Agar	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3±0,1		

Dissolvere tutti gli ingredienti, tranne il glicerolo, in 950 mL di acqua distillata portando a ebollizione. Sciogliere, separatamente, in una beuta il glicerolo in 50 mL di acqua distillata e aggiungere la soluzione al terreno 2.2.4.4. mescolando accuratamente. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo. Sterilizzare a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

2.2.4.5. Reagente A al nitrato

Composizione		
Acido sulfanilico	0,8	g
Acido acetico (15% in volume)	100	mL

Dissolvere l'acido sulfonico in acido acetico e filtrare attraverso carta da filtro. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione. Conservare, accuratamente chiuso, in bottiglie scure a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

2.2.4.6. Reagente B al nitrato

Composizione		
5-amino-2-naftelene-acido sulfonico	0,6	g
Acido acetico (15% in volume)	100	mL

Dissolvere il 5-amino-2-naftelene-acido sulfonico in acido acetico e filtrare attraverso carta da filtro. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione. Conservare, accuratamente chiuso, in bottiglie scure a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

2.2.4.7. Terreno di base al lattosio-gelatina

Composizione		
Digerito enzimatico di caseina	15	g
Estratto di lievito	10	g
Gelatina	120	g
Acqua distillata	1000	mL

Dissolvere gli ingredienti in 1 L di acqua distillata e aggiungere lattosio (2.2.4.8.) e la soluzione di rosso fenolo (2.2.4.9.) secondo le indicazioni.

2.2.4.8. Lattosio

Aggiungere 10 g di lattosio al terreno di base (2.2.4.7.) e miscelare con cura.

2.2.4.9. Soluzione di rosso fenolo

Composizione	
Rosso fenolo	4 g
Acqua distillata	100 mL

Dissolvere il rosso fenolo in acqua distillata e aggiungere 12,5 mL della soluzione al terreno di base (2.2.4.7.).

2.2.4.10. Terreno completo al lattosio - gelatina

Composizione	
Terreno di base al lattosio-gelatina (2.2.4.7.)	1000 mL
Lattosio (2.2.4.8.)	10 g
Sol. di rosso fenolo (2.2.4.9.)	12,5 mL
pH 7,5±0,1	

Sciogliere 1 L di terreno di base (2.2.4.7.) e aggiungere 10 g di lattosio (2.2.4.8.) e 12,5 g della soluzione di rosso fenolo (2.2.4.9.). Miscelare con cura evitando la formazione di bolle. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo. Sterilizzare a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di un mese in condizioni ottimali.

2.2.4.11. Agar con 5% di sangue di cavallo

È possibile utilizzare Columbia agar o qualsiasi altro analogo idoneo terreno.

2.2.4.12. Brodo Indolo - Nitrato e per la motilità (alternativo)

Composizione	
Triptone	20 g
Glucosio	1 g
Disodio idrogeno fosfato	2 g
Nitrato di potassio	1 g
Agar	1 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,2±0,2	

Il terreno può essere usato in alternativa al Terreno al nitrato e per la motilità (2.2.4.4.) per la verifica della riduzione dei nitrati a nitriti e della motilità.

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Per l'eventuale verifica della motilità aggiungere 2 g di agar ogni litro di terreno. Dopo avere sciolto la polvere in 1 L di acqua distillata. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo. Sterilizzare a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

2.2.4.13. α-naftolo

Il prodotto si trova disponibile in commercio. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione.

2.2.4.14. Polvere di zinco

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Filtrazione su membrana

Filtrare un'aliquota del campione attraverso una membrana di esteri di cellulosa 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). Porre la membrana sulla superficie del terreno Triptosio Solfito Cicloserina Agar (2.2.4.3) evitando la formazione di bolle d'aria tra la membrana e la superficie del terreno agarizzato. Incubare alla temperatura di $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (21 ± 3) ore in condizioni anaerobie.

In alternativa, e preferibilmente, dopo il trasferimento della membrana sul terreno, ricoprire interamente la membrana versando 5-6 mL dello stesso terreno ancora liquido e mantenuto alla temperatura di $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$. Lasciare solidificare e incubare alla temperatura di $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (21 ± 3) ore in condizioni anaerobie.

Ridurre al minimo il tempo, che comunque non deve eccedere le 2 ore, tra l'analisi e l'incubazione in anaerobiosi.

2.2.6. Lettura dei risultati

I microrganismi appartenenti alla specie *Cl. perfringens*, sul terreno Triptosio Solfito Cicloserina Agar (2.2.4.3), formano colonie nere o grigio/giallo-marrone che danno colorazione anche debolmente scura sopra o sotto la membrana filtrante. Contare le colonie tipiche e considerarle come *Cl. perfringens* presuntivo.

2.2.7. Isolamento

Confermare tutte le colonie di *Cl. perfringens* presuntivo, o un loro numero comunque rappresentativo. Isolare le colonie da confermare in parallelo su due capsule di Agar sangue (2.2.4.11.) incubando 1 capsula contenente il terreno in anaerobiosi e l'altra in aerobiosi, entrambe a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (21 ± 3) ore.

Dopo incubazione esaminare il terreno nutritivo per la presenza o assenza di crescita. Le colonie di *Cl. perfringens* producono tipiche aree di emolisi chiarificate sulla superficie del terreno. Procedere allo svolgimento delle prove di conferma solo per le colonie che, su Agar sangue, crescono in anaerobiosi.

2.2.8. Conferma

In alternativa alle prove di seguito descritte, per la conferma dell'appartenenza alla specie *Cl. perfringens*, le colonie sospette possono essere sottoposte direttamente a prove biochimiche di identificazione con i sistemi miniaturizzati disponibili in commercio.

Procedere allo svolgimento delle prove per la riduzione dei nitrati a nitriti/motilità e della produzione acido da lattosio/fluidificazione della gelatina.

2.2.8.1. Prova della riduzione dei nitrati e per la motilità

Immediatamente prima dell'uso, sciogliere, in bagnomaria, il Terreno al nitrato e per la motilità (2.2.4.4.) mantenendo l'acqua in ebollizione per circa 10 minuti. Fare raffreddare rapidamente. Inoculare nel terreno, con un ago sterile, la colonia sospetta e incubare, in condizioni anaerobie, a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (21 ± 3) ore. Dopo incubazione, verificare la crescita lungo la linea di infissione. La motilità si evidenzia come crescita diffusa oltre la linea di infissione. *Cl. perfringens* non è motile.

In volumi uguali miscelare il reagente A al nitrato (2.2.4.5.) e il reagente B al nitrato (2.2.4.6) immediatamente prima dell'uso e aggiungere 0,2 - 0,5 mL della miscela a ciascun tubo di Terreno al nitrato e per la motilità (2.2.4.4.) dopo la crescita della colonia da saggiare. Lo sviluppo di un colore rosso conferma la presenza di nitrito prodotto dalla riduzione del nitrato. Se entro 15 minuti non si rileva la colorazione rossa, aggiungere, con una spatola, una piccola quantità di polvere di zinco (2.2.4.14.) e attendere 10 minuti.

Se si sviluppa un colore rosso, la riduzione del nitrato non ha avuto luogo e la prova è considerata negativa. Se non si sviluppa un colore rosso, dopo l'aggiunta di polvere di zinco, il nitrato è stato completamente convertito ad azoto e la prova è considerata positiva.

2.2.8.2. Prova della riduzione dei nitrati e per la motilità (alternativo)

Inoculare nel Brodo Indolo - Nitrato e per la motilità (alternativo) (2.2.4.12.), con un ago sterile, la colonia sospetta e incubare, in condizioni anaerobiche, a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(24 + 24)$ ore. Dopo incubazione, verificare la crescita lungo la linea di infissione. La motilità si evidenzia come crescita diffusa oltre la linea di infissione. *Cl. perfringens* non è motile.

Per la verifica della riduzione del nitrato a nitrito aggiungere poche gocce di α -naftolo a ciascun tubo che presenta crescita. Lo sviluppo di un colore rosa/rosso conferma la presenza di nitrito prodotto dalla riduzione del nitrato. Se entro 15 minuti non si rileva la colorazione rosa/rossa, aggiungere, con una spatola, una piccola quantità di polvere di zinco (2.2.4.14.) e attendere 10 minuti.

Se si sviluppa un colore rosso, la riduzione del nitrato non ha avuto luogo e la prova è considerata negativa. Se non si sviluppa un colore rosso, dopo l'aggiunta di polvere di zinco, il nitrato è stato completamente convertito ad azoto e la prova è considerata positiva.

2.2.8.3. Prova della produzione di acido da lattosio e fluidificazione della gelatina

Immediatamente prima dell'uso, sciogliere, in bagnomaria, il Terreno al lattosio-gelatina (2.2.4.10.) mantenendo l'acqua in ebollizione per circa 10 minuti. Fare raffreddare rapidamente. Inoculare nel terreno, con un ago sterile, la colonia sospetta e incubare, in condizioni anaerobiche, a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per (21 ± 3) ore. Dopo incubazione, verificare lo sviluppo di una colorazione gialla per la produzione di acido dal lattosio.

Raffreddare i tubi per $(1 \div 2)$ ore a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ e verificare la fluidificazione della gelatina. Dopo 1 ora, verificare se il terreno ha solidificato; in caso negativo, mantenere i tubi a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per un'altra ora. Dopo solidificazione, l'evidenza di terreno semiliquido fornisce una reazione positiva per l'idrolisi della gelatina. Se il terreno rimane solidificato re-incubare a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per altre (21 ± 3) ore e ripetere la verifica.

2.2.9. Interpretazione dei risultati

Le colonie cresciute entro le 24 ore sul terreno Triptosio Solfito Cicloserina Agar, di colore nero o grigio/giallo-marrone che danno colorazione scura sia sopra sia sotto la membrana, non motili, che riducono i nitrati a nitriti, producono acido da lattosio e liquefano la gelatina entro 48 ore, o che l'identificazione biochimica ha dimostrato appartenere alla specie, sono da considerare *Clostridium perfringens* confermati.

2.2.10. Espressione dei risultati

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, o identificate con i sistemi miniaturizzati di prove biochimiche, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

dove

<i>C</i>	numero di colonie che sono state confermate per 100 mL
<i>A</i>	numero di colonie confermate
<i>B</i>	numero di colonie da sottoporre a conferma
<i>N</i>	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
<i>V_t</i>	volume di campione analizzato
<i>V_s</i>	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
<i>F</i>	eventuale fattore di diluizione

Bibliografia

1. Health Protection Agency. *National Standard Method. Enumeration of Clostridium perfringens by membrane filtration. W 5 Issue 3 (Rev. May 2005)*. Wales: HPA; 2004.
2. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR jr, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC jr. *Testo atlante di microbiologia diagnostica*. Roma: Delfino editore; 1995.

DETERMINAZIONE DEI BATTERI COLIFORMI A 37 °C

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Coliformi a 37 °C rilevato con i metodi ISS A [006A rev. 00; 006B rev. 00; 006C rev. 00].

I coliformi, inclusi nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*, sono batteri a forma di bastoncino, gram negativi, aerobi e anaerobi facoltativi, non sporigeni. Poiché presenti nel materiale fecale di origine umana con una densità media di 10^9 organismi/g, sono stati considerati, per decenni, insieme agli streptococchi fecali, indicatori di contaminazione delle acque. Tuttavia, è ormai ampiamente riconosciuto negli ambienti scientifici che nel gruppo sono comprese specie ambientali, in grado di colonizzare acqua, suolo e vegetazione. L'ampia diffusione nell'ambiente dei microrganismi appartenenti al gruppo ne ha quindi ridimensionato il ruolo e il significato nelle acque e contrasta nettamente con i requisiti specifici richiesti ad un indicatore di contaminazione fecale.

Gli studi più recenti distinguono i microrganismi inclusi sotto questo termine in due principali categorie che, in base alle specie, e non più al genere, differenziano i coliformi di origine fecale da quelli di origine acquatica e tellurica, naturalmente presenti nelle acque al di là di qualsiasi contaminazione.

L'appartenenza al gruppo dei coliformi, più che sulle caratteristiche sistematiche dei diversi microrganismi, si è basata storicamente sul metodo utilizzato per il loro rilevamento che sfrutta la loro capacità di fermentare il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di (35÷37) °C in 48 ore. Tuttavia, negli ultimi anni si è andata confermando la nozione che dei coliformi presenti nelle acque, una percentuale relativamente elevata non sia in grado né di fermentare il lattosio, né di produrre gas nei tradizionali terreni di coltura e, soprattutto, che i test più classici, come l'IMVIC (Indolo, Rosso Metile, Voges Proskauer, Citrato), non hanno nessun valore discriminante per l'identificazione di *Klebsiella pneumoniae*, di *Enterobacter cloacae* e delle molte specie ambientali. Diversamente, si è consolidata l'evidenza che un'alta percentuale, intorno al 99%, possiede l'enzima β -D-galattosidasi. Negli ultimi anni, sulla base di questo principio, sono stati elaborati nuovi metodi che possono rappresentare un'alternativa interessante in rapporto alle tecniche colturali classiche. Utilizzano, infatti, substrati diversi da quelli tradizionali, modificati con l'aggiunta di composti cromogeni e fluorogeni, e che si basano sullo sfruttamento di questa specifica attività enzimatica.

Nel DL.vo 31/2001 e s.m.i., recepimento della Direttiva Europea 98/83/CE, il parametro batteri coliformi a 37°C è riportato nella Parte C (parametri indicatori) dell'Allegato I. In relazione al diverso significato attribuito al gruppo, i coliformi vengono quindi considerati indicatori di qualità e di efficienza di trattamento dell'acqua. Il superamento del loro valore di parametro è tollerato fermo restando quanto stabilito nell'art. 14 del decreto e può essere segnalato come "inosservanza" del valore parametrico.

Per i parametri microbiologici, a differenza dei parametri chimici, la Direttiva Europea 98/83/CE stabilisce metodi analitici di riferimento. Tuttavia, fornisce anche agli Stati Membri la possibilità di affiancare ai metodi di riferimento stabiliti nell'Allegato III, punto 1, metodi aggiuntivi, almeno equivalenti, da utilizzare in alternativa a quelli indicati dalla legge, individuati in conformità a specifiche procedure e elaborazioni statistiche dei dati. In questo ambito, i risultati derivati dallo studio di confronto interlaboratorio organizzato dalla II Sottocommissione Metodi Gruppo Metodi Microbiologici e Biologici dell'Istituto Superiore di Sanità, hanno dimostrato che, oltre al metodo indicato nell'Allegato III (UNI EN ISO 9308-1), per il parametro batteri coliformi a 37°C, possono essere utilizzati, quali metodi ufficiali di riferimento, anche quelli di seguito riportati.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS A [006A rev. 00; 006B rev. 00; 006C rev. 00] vengono utilizzate per la determinazione dei coliformi nelle acque da destinare e destinate al consumo umano, eventualmente nelle acque di piscina, nelle acque trattate e nel dialisato standard quando trattasi di acque e soluzioni di dialisi.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo - ISS A 006A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Metodo MPN (*Most Probable Number*) a multi-pozzetto. Il metodo consente di determinare la concentrazione di batteri coliformi a 37 °C in un determinato volume di acqua. È applicabile all'analisi di acque poco e mediamente contaminate, anche disinfettate e di piscina, e comunque ad acque contenenti coliformi danneggiati.

Il metodo permette di determinare simultaneamente e direttamente la concentrazione di batteri coliformi a 37°C e di *Escherichia coli* in campioni di acqua tramite una stima statistica calcolata in funzione del numero di pozzetti positivi e negativi ottenuti aggiungendo 100 mL di campione al substrato di crescita. Il risultato può essere ricavato dall'apposita tabella già predisposta (Tabella 1). Dopo un periodo di incubazione di circa 18 ore a (36 ± 1) °C si procede alla lettura dei risultati. La presenza di coliformi viene evidenziata dalla colorazione gialla che appare nei pozzetti dovuta alla produzione di o-nitrofenolo (giallo) rilasciato dall'idrolisi dell'ONPG (Ortonitrofenil-β-D-galattopiranoside) catalizzata dall'enzima β-D-galattosidasi, caratteristico dei coliformi. Contemporaneamente può essere messo in evidenza *Escherichia coli* che produce fluorescenza nei pozzetti gialli se esposti ad una lampada a luce ultravioletta, dopo l'idrolisi del 4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide (MUG).

Il metodo è stato riportato dal Manuale *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, sotto il nome di *Enzyme Substrate Coliform Test*, dall'edizione del 1996. L'*Environmental Protection Agency* americana (US EPA) ha approvato il metodo e le sue successive modifiche sotto il nome di MMO-MUG test dal 1989. L'*Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) ha approvato il metodo con il nome di *Defined Substrate Technology* (Colilert) dal 1995. È riconosciuto per l'analisi delle acque potabili nella gran parte dei paesi dell'Unione Europea e in alcune decine di paesi nel mondo ed è riportato nel Manuale dei Metodi Analitici per le Acque del 2003.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice) sono necessari:

- Buste a multi-pozzetto Quanti-Tray™
- Comparatore di riferimento Quanti-Tray™
- Flaconi di plastica con antischiuma (100 mL) oppure flaconi in vetro con chiusura a vite di Schott sterilizzabili in autoclave, sterili
- Termosigillatrice automatica Quanti-Tray™

2.1.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare è pari 100 mL, sia che si tratti del campione tal quale, sia che si tratti di una sua diluizione, quest'ultima da determinare comunque in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare.

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Colilert Quanti-Tray™

Composizione	
Ammonio solfato	5 g
Manganese solfato	0,5 g
Zinco solfato	0,5 mg
Magnesio solfato	100 mg
Sodio cloruro	10 g
Calcio cloruro	50 g
Sodio solfito	40 g
Amfotericina B	1 mg
O-nitrofenil-β-D-galattopiranoside	0,5 g
4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide	75 mg
Solanium	0,5 g
Hepes buffer	
Sali di sodio	5,3 g
Acido organico	6,9 g

Il terreno si trova anche in commercio in fiale già predosate per l'esame di 100 mL di campione o di una sua diluizione. Il terreno, prodotto sotto forma granulare, si mantiene 24 mesi dalla data di produzione. Conservare le fiale a (2÷25) °C.

Nell'esecuzione dell'analisi seguire le istruzioni della ditta produttrice e attenersi alle comuni norme di sicurezza previste per i laboratori di microbiologia.

Il prodotto è certificato come non tossico.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Miscelazione del campione

Aggiungere il terreno disidratato ad un volume di 100 mL del campione da analizzare. Miscelare con cura e, dopo che la polvere si è completamente sciolta, attendere qualche minuto. Versare la soluzione così ottenuta in una busta a multi-pozzetto Quanti-Tray™. Sigillare la busta inserendola nella termosigillatrice automatica Quanti-Tray™. La busta viene sigillata in 15 secondi.

Incubare a (36 ± 1) °C per 18 ore (fino a un massimo di 22 ore). Non sono richieste prove di conferma.

2.1.6. Interpretazione dei risultati

Dopo incubazione, contare il numero di pozzetti gialli, eventualmente confrontando il colore rispetto al comparatore, e calcolare il valore MPN facendo riferimento alla relativa Tabella 1.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare sospensioni separate o una miscela di microrganismi: controllo positivo: *E. coli* NCTC 9001, *Klebsiella aerogenes* NCTC 9528 o *K. pneumoniae* ATCC 33186; controllo negativo: *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662.

In alternativa, in ogni caso, utilizzare colture di riferimento certificate: controlli positivi, *E. coli* e *Klebsiella aerogenes*; controllo negativo, *Pseudomonas aeruginosa*.

2.1.7. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come MPN/100 mL; considerare l'eventuale diluizione qualora il campione non sia stato analizzato tal quale.

Nell'evenienza in cui non risultino pozzetti positivi (risultato ottenuto in base alla Tabella 1: <1/100 mL), l'analisi va considerata statisticamente equivalente ad un test di P/A (Presenza/Assenza). In questo caso riportare quindi il risultato come 0/100 mL.

È da considerare che, qualora si ottenga un valore non intero – caso questo non contemplato dalla legge - si ritiene comunque indispensabile approssimare all'unità il risultato, per difetto quando il valore della parte decimale sia $\leq 0,5$, altrimenti per eccesso.

2.1.8. Caratteristiche di prestazione del metodo

La valutazione delle prestazioni del metodo, come parte di un programma di prove tra 4 laboratori ha fornito i risultati di seguito riportati:

Sensibilità: 100%

Specificità: 98%

Recupero (*E. coli* NCTC 9001, *Kl. aerogenes* NCTC 9528): 110%

Klebsiella pneumoniae: Ripetibilità = 0,008; Riproducibilità = 0,007

Intervalli di confidenza: corrispondenti a quelli calcolati sulla base della formula $MPN = Nx \ln N/N-X$ (dove N = numero totale di pozzetti e X = numero di pozzetti risultati positivi) della Tabella 1 ⁽²⁾.

La valutazione dell'equivalenza del metodo (ISO 17994), come parte di un programma di prove tra 9 laboratori, ha fornito i risultati di seguito riportati:

Normalità (Rankit plots - Wilk-Shapiro): 97%

N. colonie sottoposte a conferma 4263 (n % di z =90%); tasso di conferma 89%

Differenza media relativa minima significativa delle conte confermate rispetto a UNI EN ISO 9308-1: + 65%.

Tabella 1. Tabella MPN Quanti -Tray® a 51 pozzetti

N. di pozzetti positivi in un campione da 100 mL	Numero più probabile	Intervallo di confidenza del 95% inferiore	Intervallo di confidenza del 95% superiore
0	< 1	0,0	3,7
1	1,0	0,3	5,6
2	2,0	0,6	7,3
3	3,1	1,1	9,0
4	4,2	1,7	10,7
5	5,3	2,3	12,3
6	6,4	3,0	13,9
7	7,5	3,7	15,5
8	8,7	4,5	17,1
9	9,9	5,3	18,8
10	11,1	6,1	20,5
11	12,4	7,0	22,1
12	13,7	7,9	23,9
13	15,0	8,8	25,7
14	16,4	9,8	27,5
15	17,8	10,8	29,4
16	19,2	11,9	31,3
17	20,7	13,0	33,3
18	22,2	14,1	35,2
19	23,8	15,3	37,3
20	25,4	16,5	39,4
21	27,1	17,7	41,6
22	28,8	19,0	43,9
23	30,6	20,4	46,3
24	32,4	21,8	48,7
25	34,4	23,3	51,2

segue

⁽²⁾ Niemelä SI. *Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms*. Helsinki: Mittatekniikan Keskus, Centre for Metrology and Accreditation, MIKES Publication J4; 2003.

continua

N. di pozzetti positivi in un campione da 100 mL	Numero più probabile	Intervallo di confidenza del 95% inferiore	Intervallo di confidenza del 95% superiore
26	36,4	24,7	53,9
27	38,4	26,4	56,6
28	40,6	28,0	59,5
29	42,9	29,7	62,5
30	45,3	31,5	65,6
31	47,8	33,4	69,0
32	50,4	35,4	72,5
33	53,1	37,5	76,2
34	56,0	39,7	80,1
35	59,1	42,0	84,4
36	62,4	44,6	88,8
37	65,9	47,2	93,7
38	69,7	50,0	99,0
39	73,8	53,1	104,8
40	78,2	56,4	111,2
41	83,1	59,9	118,3
42	88,5	63,9	126,2
43	94,5	68,2	135,4
44	101,3	73,1	146,0
45	109,1	78,6	158,7
46	118,4	85,0	174,5
47	129,8	92,7	195,0
48	144,5	102,3	224,1
49	165,2	115,2	272,2
50	200,5	135,8	387,6
51	> 200,5	146,1	infinito

2.2. Metodo - ISS A 006B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri coliformi che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno culturale agarizzato. Dopo incubazione alla temperatura di $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(18 \div 24)$ ore, contare le colonie tipiche (coliformi presuntivi) e sottoporle a conferma per la verifica dell'appartenenza al gruppo dei coliformi.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice).

2.2.3 Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 100 mL (250 mL per l'acqua imbottigliata), è comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.2.4. Terreni di coltura e reagenti

2.2.4.1. M-Endo agar LES

Composizione		
Estratto di lievito	1,2	g
Casitone	3,7	g
Tiopeptone	3,7	g
Triptosio	7,5	g
Lattosio	9,4	g
Potassio diidrogeno fosfato	1,0	g
Dipotassio idrogeno fosfato	3,3	g
Sodio cloruro	3,7	g
Sodio desossicolato	0,1	g
Sodio lauril solfato	0,05	g
Sodio solfito	1,6	g
Fucsina basica	0,8	g
Agar	15,0	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere in 1 L di acqua distillata contenente 20 mL di etanolo al 95% (V/V), distribuire in capsule di Petri. Non sterilizzare. È preferibile preparare il terreno al momento dell'uso e comunque, una volta preparato, mantenerlo al riparo dalla luce. Conservare il terreno a (5 ± 3) °C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

Il terreno è classificato come Xn - Nocivo. La scheda di sicurezza, a cui è necessario fare riferimento, informa che la presenza di fucsina basica (Magenta I) comporta la possibilità di effetti irreversibili (R40) e il prodotto può presentare un rischio di cancerogenesi (categoria 1). Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

2.2.4.2. Agar soia triptone

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

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a (121 ± 3) °C per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

2.2.4.3. Brodo lattosato al bromocresolo

Composizione		
Peptone	5	g
Lattosio	5	g
Estratto di carne	2	g
Porpora di bromocresolo	0,025	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. Dopo avere sciolto la polvere, distribuire in tubi e sterilizzare a (115 ± 3) °C per 20 min. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

2.2.4.4. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Composizione		
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. È da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Filtrazione

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa 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). Porre la membrana sulla superficie del terreno M-Endo agar LES (2.2.4.1.) e procedere all'incubazione a (36 ± 1) °C per (18÷24) ore.

2.2.5.2. Lettura dei risultati

Dopo incubazione sul terreno M-Endo agar LES (2.2.4.1.), la lettura dei risultati deve essere effettuata al più presto allo scopo di evitare che la luce provochi alterazioni cromatiche delle colonie.

Le colonie cresciute entro le 24 ore, di colore rosso con riflesso metallico e, generalmente, sviluppo di una colorazione rosso mattone scuro nel terreno sotto la membrana, si considerano formate da batteri coliformi (coliformi presuntivi).

2.2.5.3. Prove di conferma

Per la verifica dell'appartenenza al gruppo dei coliformi è d'obbligo effettuare almeno la verifica della presenza dell'enzima citocromossidasi su, preferibilmente, tutte o su un numero comunque rappresentativo di colonie tipiche.

Per quanto precedentemente evidenziato, a discrezione dell'operatore è anche possibile procedere alla prova della fermentazione del lattosio.

È possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio.

Prima di effettuare ciascuna prova di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Agar soia triptone (2.2.4.2.) incubando a (36±1) °C per (18÷24) ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.2.5.4. Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. I coliformi sono ossidasi-negativi.

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Agar soia triptone (2.2.4.2.) e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.2.4.4.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. Una reazione negativa (tipica dei coliformi) si manifesta con il mancato sviluppo di colore, mentre i microrganismi citocromossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.

2.2.5.5. Prova della fermentazione del lattosio

La prova sfrutta la capacità dei coliformi di fermentare il lattosio alla temperatura di (36 ± 1) °C in 24-48 ore.

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia sospetta subcoltivata sul terreno Agar soia triptone (2.2.4.2.) e inoculare in un tubo del Brodo lattosato al bromocresolo (2.2.4.3.). Incubare a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per $(24 \div 48)$ ore.

I batteri appartenenti al gruppo dei coliformi fermentano il lattosio evidenziabile dal viraggio al giallo dell'indicatore porpora di bromocresolo.

2.2.6. Interpretazione dei risultati

Le colonie cresciute entro le 24 ore, di colore rosso con riflesso metallico, citocromossidasi-negative, eventualmente lattosio positive, o che l'identificazione biochimica ha dimostrato appartenere a specie del gruppo dei coliformi, sono da considerare coliformi confermati.

Per controlli di qualità utilizzare culture di riferimento certificate: controlli positivi, *E. coli* e *Klebsiella aerogenes*; controllo negativo, *Pseudomonas aeruginosa*.

2.2.7. Espressione dei risultati

Il numero di coliformi isolati si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma, considerando l'eventuale diluizione e riportando il valore come numero per 100 mL di campione (N./100 mL).

Qualora si tratti di acque imbottigliate considerare come volume di riferimento 250 mL.

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

dove

<i>C</i>	numero di colonie che sono state confermate per 100 mL
<i>A</i>	numero di colonie confermate
<i>B</i>	numero di colonie sottoposte a conferma
<i>N</i>	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
<i>V_t</i>	volume di campione analizzato (in mL)
<i>V_s</i>	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
<i>F</i>	fattore di diluizione

2.2.8. Caratteristiche di prestazione del metodo

La valutazione delle prestazioni del metodo, come parte di un programma di prove tra laboratori (UNI ENV ISO 13843), ha fornito i risultati di seguito riportati:

Sensibilità: 87%

Specificità: 80%

La valutazione dell'equivalenza del metodo (ISO 17994), come parte di un programma di prove tra 7 laboratori, ha fornito i risultati di seguito riportati:

Normalità (Rankit plots - Wilk-Shapiro): 97%

N °Colonie sottoposte a conferma 4606 (n % di z =92%); tasso di conferma 71%

Differenza media relativa minima significativa delle conte confermate rispetto a UNI EN ISO 9308-1: + 31%.

2.3. Metodo - ISS A 006C rev. 00

2.3.1. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri coliformi che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione alla temperatura di $(36 \div 1)^\circ\text{C}$ per $(18 \div 24)$ ore, contare le

colonie tipiche (coliformi presuntivi) e sottoporle a conferma per la verifica dell'appartenenza al gruppo dei coliformi.

Il metodo fa riferimento alla norma UNI EN ISO 9308-1:2002.

2.3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice).

2.3.3 Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 100 mL, è comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.3.4. Terreni di coltura e reagenti

2.3.4.1. Terreno di base agarizzato al lattosio TTC con eptadecilsolfato di sodio

Composizione		
Lattosio	20	g
Peptone	10	g
Estratto di lievito	6	g
Estratto di carne	5	g
Blu di bromotimolo	0,05	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,1		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 min. A 1 L di terreno, aggiungere sterilmente 50 mL di soluzione di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) (2.3.4.2.) e 50 mL di soluzione di eptadecilsolfato di sodio (Tergitol 7) (2.3.4.3.), miscelando con cura. In alcune formulazioni il terreno ha già tra i suoi componenti il Tergitol 7; in tal caso aggiungere solamente 50 mL di soluzione di TTC. È preferibile preparare il terreno al momento dell'uso e comunque, una volta preparato, mantenerlo al riparo dalla luce. Conservare il terreno a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di 10 giorni in condizioni ottimali.

2.3.4.2. Soluzione di TTC

Composizione		
2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC)	0,05	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere il TTC in acqua distillata e portare al volume di 100 mL. Sterilizzare per filtrazione attraverso una membrana con pori di dimensioni nominali pari a $0,2\ \mu\text{m}$.

2.3.4.3. Soluzione di eptadecilsolfato di sodio

Composizione		
Eptadecilsolfato di sodio (Tergitol 7)	0,2	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere il Tergitol 7 in acqua distillata e portare al volume di 100 mL. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 min.

2.3.4.4. Terreno completo

Composizione	
Terreno di base (2.3.4.1.)	1000 mL
Sol. TTC (2.3.4.2.)	50 mL
Sol. di eptadecilsolfato di sodio (2.3.4.3)	50 mL

Sciogliere il terreno di base e far raffreddare a (50 ± 5) °C. Rispettando le comuni regole di asepsi, aggiungere la soluzione di TTC e quella di Tergitol 7 (se non già nel terreno di base) e miscelare con cura evitando la formazione di bolle. Distribuire in capsule di Petri ad uno spessore di almeno 5 mm e lasciare solidificare. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di 10 giorni in condizioni ottimali.

2.3.4.5. Agar soia triptone

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

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a (121 ± 3) °C per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

2.3.4.6. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Composizione	
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. È da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa.

2.3.5. Procedura**2.3.5.1. Filtrazione**

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa 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 0,7/0,2 µm). Porre la membrana sulla superficie del terreno agarizzato al lattosio TTC con eptadecilsolfato di sodio (2.3.4.4.) e procedere all'incubazione a (36 ± 1) °C per (18÷24) ore.

2.3.5.2. Lettura dei risultati

Dopo incubazione contare tutte le colonie cresciute entro le 24 ore, che mostrano lo sviluppo di una colorazione gialla nel terreno sotto la membrana (coliformi presuntivi).

2.3.5.3. Prove di conferma

Per la verifica dell'appartenenza al gruppo dei coliformi è d'obbligo effettuare la verifica della presenza dell'enzima citocromossidasi su, preferibilmente, tutte o su un numero comunque rappresentativo di colonie tipiche.

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 Agar soia triptone (2.3.4.5.) incubando a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per (18÷24) ore. Eseguire la prova su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.3.5.4. Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. I coliformi sono citocromossidasi-negativi.

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Agar soia triptone (2.3.4.5.) e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.3.4.6.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. Una reazione negativa (tipica dei coliformi) si manifesta con il mancato sviluppo di colore, mentre i microrganismi citocromossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.

2.3.6. Interpretazione dei risultati

Le colonie tipiche cresciute entro le 24 ore, citocromossidasi-negative, o che l'identificazione biochimica ha dimostrato appartenere a specie del gruppo dei coliformi, sono da considerare coliformi confermati.

2.3.7. Espressione dei risultati

Il numero di coliformi isolati si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma, considerando la eventuale diluizione e riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

Qualora si tratti di acque imbottigliate considerare come volume di riferimento 250 mL.

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

dove

<i>C</i>	numero di colonie che sono state confermate per 100 mL
<i>A</i>	numero di colonie confermate
<i>B</i>	numero di colonie sottoposte a conferma
<i>N</i>	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
<i>V_t</i>	volume di campione analizzato (in mL)
<i>V_s</i>	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
<i>F</i>	fattore di diluizione

2.3.8. Caratteristiche di prestazione del metodo

Nell'ambito di un programma di prove tra 15 laboratori per la valutazione dell'equivalenza di metodi (ISO 17994), sono stati ottenuti i risultati di seguito riportati:

N °Colonie sottoposte a conferma 19601 (n % di z =88%); tasso di conferma 49%.

Bibliografia

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th, ed. Washington, DC: APHA; 2005.

2. APAT/IRSA-CNR. *Metodi Analitici per le Acque*. 29/2003. Roma: APAT/IRSA-CNR; 2003.
3. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of AOAC*. 16th ed.; 1995.
4. Bonadonna, L. Coliformi totali sul substrato mEndo: un parametro critico nella routine delle analisi microbiologiche. *Tecnica Sanitaria* 1994;32:151-9.
5. ISO 17994. *Water quality - Criteria for establishing equivalence between microbiological methods*. Geneva: International Organization for Standardization; 2004.
6. Niemelä SI. *Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms*. Helsinki: Mittatekniikan Keskus, Centre for Metrology and Accreditation, MIKES Publication J4; 2003.
7. UNI EN ISO 9308-1. *Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione di Escherichia coli e batteri coliformi - Metodo di filtrazione su membrana*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.
8. UNI ENV ISO 13843. *Qualità dell'acqua - Guida per la validazione di metodi microbiologici*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.

DETERMINAZIONE DELLE ALGHE

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Alghe rilevato con il metodo ISS A 007A rev. 00.

Le alghe fitoplanctoniche, visibili solo al microscopio ottico sono le alghe che rivestono maggiore interesse per la valutazione della qualità delle acque destinate alla produzione di acqua potabile. Sono organismi vegetali fotoautotrofi e comprendono specie unicellulari, pluricellulari e coloniali.

Possiedono plastidi, organuli discoidali che, a seconda delle specie, possono essere, non solo in numero vario, ma presentarsi disposti in modo diverso a pile o nastriformi, oppure trovarsi singolarmente nella matrice cellulare se le dimensioni sono piuttosto grandi. I plastidi contengono clorofilla e altri pigmenti fotosintetici e sono di fondamentale importanza per lo studio tassonomico. Particolare rilievo assume la determinazione numerica e tassonomica delle alghe appartenenti a specie potenzialmente tossiche e a specie capaci di produrre sostanze odorigene, nonché la sorveglianza sulla periodicità dei fenomeni di fioritura (*blooms*). Infatti, con adeguate condizioni ambientali, le alghe possono produrre spessi strati di cellule nei corpi idrici superficiali. Le fioriture sono comunemente costituite da Cianobatteri, molte specie dei quali sono in grado di produrre diverse categorie di tossine. Oltre alle tossine, i Cianobatteri possono essere produttori di una grande varietà di sostanze, molte delle quali sono dotate di proprietà odorose acute e persistenti che possono rendere l'acqua potabilizzata inaccettabile per gli utenti. Altri taxa producono sostanze che conferiscono odori o sapori particolari all'acqua: Crisoficee, Criptoficee, alcune specie di Dinoficee pigmentate, di Cloroficee e di Diatomee.

È stato più volte evidenziato che i trattamenti convenzionali di potabilizzazione delle acque (coagulazione/filtrazione, filtrazione su sabbia, clorazione) sono in grado di rimuovere soltanto basse percentuali di tossine algali disciolte. L'ozono e il carbone attivo granulare sembrano invece avere una elevata efficacia nella rimozione di cianotossine. Per acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione è altresì importante rilevare la presenza di alghe con tendenza alla flottazione, particolarmente difficili da rimuovere nel processo di chiariflocculazione.

Il metodo riportato permette di stabilire il numero delle unità algali e non delle cellule algali, intendendo, come unità algale, la singola cellula nelle forme unicellulari e l'intera colonia nelle forme coloniali (*Volvox*, *Pediastrum* vengono, in questo caso, considerate unità algale), e come cellule algali, una unità costituita dalla singola cellula anche se appartenente ad una colonia (ad esempio, nelle forme coloniali, come *Volvox* o *Pediastrum*, vengono enumerate le singole cellule).

Nel DL.vo n. 31 del 2001 e successive modifiche e integrazioni, al paragrafo Avvertenza dell'Allegato I, è prevista la determinazione qualitativa del parametro con riferimento ad un litro di campione di acqua, equivalente al volume minimo da analizzare, così come stabilito dal DL.vo n. 27 del 2002. Tuttavia, il metodo di seguito riportato fornisce la possibilità di ottenere risultati quantitativi. Ai sensi dell'attuale normativa, le alghe nelle acque destinate al consumo umano sono da considerare come un indice di qualità; pertanto la loro presenza è ammessa, anche se ne è auspicabile l'assenza.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica ISS A 007A rev. 00 viene utilizzata per la determinazione di alghe nelle acque da destinare e destinate al consumo umano ed eventualmente nelle acque di piscina.

2. Principio del metodo

Nonostante la normativa richieda soltanto una determinazione qualitativa della presenza di alghe (Avvertenza, Allegato I), con il metodo di seguito riportato viene data la possibilità di quantificare il numero degli elementi algali eventualmente presenti. Il metodo descritto prevede l'osservazione diretta al microscopio ottico invertito dopo sedimentazione del campione in apposite camere di vetro con fondo quadrettato. In questo modo viene assicurata l'osservazione di un campione inalterato, poiché il materiale particolato in esso contenuto viene osservato direttamente dopo un solo passaggio di sedimentazione spontanea; viene contestualmente consentita la valutazione microscopica e macroscopica delle caratteristiche morfologiche degli individui presenti e la qualità complessiva del preparato e tutto viene registrato nel referto analitico.

Il principio è derivato dal metodo di Utermohl; inoltre è possibile distinguere e contare alghe pigmentate (individui vivi) e alghe non pigmentate (individui morti).

La manipolazione di campioni per analisi biologiche, in generale, può esporre l'operatore al rischio di contatto con organismi patogeni, quindi si raccomanda di seguire le norme di sicurezza previste dal DL.vo 626/1994; prima e dopo l'esecuzione dell'osservazione microscopica, procedere alla disinfezione degli oculari del microscopio con disinfettante diluito in acqua.

3. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio è necessario avere a disposizione:

- Pipette Pasteur in vetro
- Parafilm
- Microscopio ottico invertito corredato di obiettivi 4x, 10x, 20x, 40x, 60x;
- Micrometro oculare
- Camere di sedimentazione

Indicativamente, si possono utilizzare camere di sedimentazione in vetro della capacità di 500 mL, di forma cilindrica e altezza di 95 mm, con base quadrettata per fotoincisione (dimensione quadretti 1 mm x 1 mm, area osservabile 0,9216 mm² per ciascun quadrato escludendo le aree coperte dai bordi dei quadretti) di diametro 95 mm e area di base totale osservabile di 7084,625 mm². Durante il periodo di sedimentazione, le camere possono essere coperte con capsule di Petri adatte alla camera utilizzata.

La scelta della capacità maggiore o minore delle camere è dettata rispettivamente dalla maggiore o minore presunta presenza numerica di alghe nel campione esaminato.

3.1. Pulizia delle camere di sedimentazione

Per maggiore precisione e orientativamente, si descrive l'operazione di pulizia delle camere di sedimentazione.

Riempire la camera di una soluzione acquosa di disinfettante (4.2.) e lasciarla in contatto con il disinfettante per alcune ore, preferibilmente (3÷4) ore; quindi lavare accuratamente la superficie della camera, particolarmente il fondo e la porzione interna che è stata a contatto con il campione di acqua, con detergente cremoso non abrasivo, spugnetta non abrasiva e acqua di rubinetto. Sciacquare con acqua di rubinetto, risciacquare con acqua distillata e mettere ad asciugare in stufa a (55÷60) °C per alcune ore.

In alternativa, è possibile, dopo il risciacquo con acqua distillata, asciugare la camera con carta assorbente e metterla in stufa a (55÷60) °C fino a completa asciugatura; si tenga presente che eventuali microrganismi particolarmente affini alla superficie interna della camera di sedimentazione, come ad esempio le microamebe, non vengono rimossi con quest'ultimo metodo e di ciò si dovrà tener conto nella lettura del campione successivo.

Prima di utilizzare la camera per un nuovo campione, è bene verificare al microscopio invertito che il fondo sia perfettamente pulito, prima con l'obiettivo 4x, poi, se necessario, con gli obiettivi a maggiore ingrandimento. Nel caso che la camera sia stata asciugata con carta assorbente, saranno visibili sul fondo alcuni filamenti di carta dall'aspetto caratteristico, che, tuttavia, non interferiranno con la lettura del campione.

4. Reagenti e prodotti di consumo

4.1. Reattivo di Lugol

Composizione		
Iodio	5	g
Ioduro di potassio	10	g
Acido acetico glaciale	10	mL
Acqua distillata	100	mL

Da usare, con le dovute precauzioni, sotto cappa chimica.

4.2. Soluzione disinfettante

Possono essere utilizzati agenti disinfettanti tipo Desogen o Citrosil al 3% in acqua per la disinfezione degli oculari del microscopio e delle camere di sedimentazione.

4.3. Detergente e accessori

Detergente cremoso non abrasivo e spugnetta non abrasiva per la pulizia delle camere di sedimentazione; usare carta assorbente per asciugare la camera.

5. Procedura

5.1. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 1 litro, può anche essere esaminato in due aliquote da 500 mL ciascuna per campioni di acque a basso grado di contaminazione (acque finali, distribuite, fasi intermedie del trattamento di potabilizzazione).

Il campione deve essere raccolto in bottiglie di vetro pulite, ma non necessariamente sterili; in ogni caso è necessario evitare di raccogliere il campione in bottiglie contenenti tiosolfato di sodio.

5.2. Campionamento

Prelevare, in maniera idonea, almeno 1 litro di acqua in una bottiglia di vetro pulita e asciutta, scegliendo, in funzione della qualità dell'acqua il volume più idoneo di campione.

5.3. Preparazione del campione a fresco

Agitare accuratamente il campione e versare, preferibilmente dividendo in due aliquote separate da 500 mL ciascuna, in camere di sedimentazione. Fare sedimentare per un periodo minimo di 4 ore e, di norma, non superiore alle 24 ore; in questo modo tutto il materiale eventualmente presente nel campione risulterà inalterato e chiaramente visibile sul fondo.

Nel caso di acque grezze e con elevato contenuto di alghe, mettere a sedimentare un volume non inferiore ai 5 mL, utilizzando camere più piccole e lasciando sedimentare per un periodo minimo di 1 ora e non superiore alle 24 ore.

5.4. Preparazione del campione fissato

Nel caso si renda necessario, soprattutto quando il conteggio viene eseguito oltre le 24 ore dall'inizio dell'analisi, è possibile fissare il campione aggiungendo reattivo di Lugol (4.1.) a goccia a goccia fino a che l'acqua non assumerà una colorazione "cognac"; la fissazione del campione può essere effettuata sia nella bottiglia di prelievo sia nella camera di sedimentazione. Dopo l'aggiunta del Lugol, per la volatilità dei componenti, è necessario coprire i contenitori (bottiglia di prelievo o camera di sedimentazione) e sigillare bene con il parafilm o, in alternativa, conservare sotto cappa chimica accesa.

La fissazione con il reattivo di Lugol può comportare l'alterazione dei Nematodi e di altri organismi sensibili ed, in ogni caso, impedisce la distinzione tra elementi vivi e morti.

5.5. Centratura del microscopio

Per maggiore precisione, si descrive la procedura corretta per la centratura del microscopio. L'operazione consiste nel mettere a fuoco e centrare il condensatore in modo che la luce che lo attraversa formi l'immagine nella giusta posizione sopra il preparato; in questo modo si ottengono le migliori condizioni di risoluzione e di contrasto. In teoria l'operazione sarebbe da ripetere ad ogni cambio di obiettivo e/o di oculare, ma in pratica è consigliabile eseguirla periodicamente, per mantenere nel tempo le stesse condizioni di lavoro. La procedura prevede le seguenti fasi:

- mettere a fuoco il preparato con l'obiettivo 10x;
- chiudere completamente il diaframma di campo e aprire il diaframma di apertura; nel campo ottico sarà visibile il campo luminoso nella minima estensione consentita;
- alzare al massimo il condensatore ed, agendo sulle apposite manopole, regolarne la posizione in modo da centrare il campo luminoso del diaframma al centro del campo ottico;
- quindi regolare in altezza il condensatore finché i bordi dell'immagine del diaframma di campo non diventano nitidi;
- riaprire parzialmente il diaframma di campo in modo da ottenere un campo luminoso di diametro leggermente inferiore al campo ottico;
- regolare, infine, il diaframma di apertura prima chiudendolo lentamente fino a percepire nell'immagine una variazione di contrasto, quindi riaprendolo leggermente.

Prima e dopo l'esecuzione dell'osservazione microscopica, procedere alla disinfezione degli oculari con un agente disinfettante al 3% in acqua (4.2.) per evitare la trasmissione di eventuali infezioni oculari da un operatore all'altro.

5.6. Screening del campione

Volendo eseguire uno screening del campione prima del conteggio degli organismi, si consiglia di applicare la procedura di seguito descritta.

Lo screening è utile per la valutazione dell'omogenea distribuzione del materiale sedimentato al fine di scegliere i campi su cui effettuare la conta mediante l'ausilio di obiettivi a maggiore risoluzione.

Per la fase di screening utilizzare l'obiettivo 4x e osservare tutto il fondo della camera di sedimentazione; questo ingrandimento consente di osservare ogni volta un campo microscopico di 16 riquadri (4 x 4).

Mettere a fuoco i campi per verificare che la sedimentazione sia completata e per rilevare l'eventuale presenza di alghe flottanti annotando l'osservazione nel responso analitico.

Annotare la presenza nel campione di materiale inerte (ad esempio, sabbia, carbone ecc.) o di residui vegetali osservabili nel campo microscopico inquadrato valutandoli come:

- 1 assenti
- 2 rari (1 - 2)
- 3 alcuni (2 - 10)
- 4 numerosi (10 - 20)
- 4 abbondanti (30 - 100)
- 5 eccessivi (maggiori di 100)

Annotare sul referto la valutazione complessiva della qualità del campione.

Durante l'esecuzione di questa procedura è possibile enumerare, oltre alle alghe, anche Nematodi, nonché tutte le altre forme di Metazoi piuttosto comuni nelle acque superficiali, come Rotiferi, Gastrotrichi, Tardigradi, Briozoi e alcune classi di Crostacei (Fillopodi, Ostracodi e Copepodi), e Protozoi. Possono essere osservati anche altri reperti, come uova, larve di insetti, semi, pollini e varie strutture circolari difficilmente riconducibili ad organismi definiti. È possibile discriminare la presenza di materiali inerti o detriti, di strutture vegetali e/o animali (frammenti e filamenti) dagli organismi strutturati, viventi e non viventi e valutare complessivamente la qualità del campione in quanto ad elementi figurati.

5.7. Esame microscopico

L'osservazione del campione in giornata è sempre da preferire; è comunque accettabile l'osservazione effettuata nel giorno successivo perché potrebbe essere trascurabile il grado di alterazione del campione se non sono presenti protozoi vivi, predatori di elementi algali. L'osservazione effettuata sul campione a fresco (non fissato) nei (3÷4) giorni successivi al prelievo può essere comunque attendibile, fatto salvo che va comunque considerata qualitativa, giacché potrebbero essere intervenuti fenomeni di alterazione del campione e processi riproduttivi.

La camera di sedimentazione dovrà preferibilmente essere tenuta vicino al microscopio per ridurre al minimo il rischio di agitazione del campione.

5.8. Conteggio delle unità algali

Il conteggio viene effettuato con obiettivi 10x o 20x; per l'identificazione può essere necessario l'ausilio di obiettivi a risoluzione maggiore.

Si consiglia di procedere come di seguito descritto. Scegliere 3 quadrati grandi, di lato 1 cm, non adiacenti, marcati da una linea più spessa (costituiti ognuno da 10 x 10 quadretti) identificati con A B C ed effettuare la conta di tutte le unità algali depositate nell'area di lettura individuata. La scelta dei campi microscopici può essere effettuata con l'ausilio della tabella dei numeri randomizzati e la verifica della casualità della distribuzione delle particelle algali nei campi considerati mediante una serie di 5 conteggi replicati e l'applicazione del test del χ^2 .

Per ogni campo scelto discriminare numericamente i gruppi algali (ad esempio, Cianobatteri, Crisofite, Diatomee, Flagellate, Coniugate, Dinoflagellati, Clorofite). Segnalare se un gruppo od una singola specie (ove è possibile effettuare la speciazione) è prevalente sugli altri.

Si considera sufficiente l'identificazione a livello del genere. Per l'identificazione può essere utile avvalersi della misura delle dimensioni delle singole alghe presenti, da effettuarsi con l'uso del micrometro oculare e dell'ausilio dei manuali per l'identificazione indicati in bibliografia.

Conteggiare il numero di unità algali/mL presenti nel campione utilizzando un foglio di calcolo predisposto od applicando la formula descritta in 5.9.

5.8.1. Misurazione con il micrometro oculare del materiale osservato

Volendo determinare le dimensioni (in μm) degli elementi algali individuati, procedere moltiplicando il numero delle tacche misurate col micrometro oculare per i coefficienti micrometrici (i coefficienti micrometrici si ottengono dal rapporto fra il micrometro-oculare e il micrometro-oggetto), considerando che ad ogni obiettivo corrisponde un coefficiente micrometrico.

5.9. Calcolo delle Unità Algali

Calcolare il numero medio di unità algali presenti in un quadrato di lato 1 mm come risultato della media dei valori letti su tre quadrati di lato 1 cm (A, B e C); quindi calcolare il numero di unità algali (N.) per mL applicando la seguente formula e riportando il numero a 1000 mL di campione:

$$N./mL = N_i \times A/a \times 1/N_i \times 1/V$$

dove:

N_i	numero totale di unità algali contate nelle aree considerate
A	area totale della camera di sedimentazione in mm ²
a	area del campo microscopico in mm ²
N_i	numero di campi contati
V	volume del campione sedimentato in mL

6. Interferenze

Possono essere causa di interferenza nella lettura dei risultati la presenza di cristalli e altri materiali, artefatti dovuti alla fissazione od alla raccolta del campione in bottiglie contenenti tiosolfato di sodio; presenza di graffi e di bolle di aria sul fondo della camera di sedimentazione spesso sono dovuti ad errata pulizia della camera.

7. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come numero di individui/1L.

Bibliografia

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th, ed. Washington, DC: APHA; 2005.
2. Bourrelly P (Ed.). *Les algues d'eau douce*. Parigi: N Boubée & C; 1972.
3. Prescott G.W. *How to know the Freshwater algae*. Iowa: W. C. Brown Company Publishers Dubuque; 2000.
4. Streble H, Krauter D. *Atlante dei microrganismi acquatici*. Padova: Franco Muzzio & C; 1984.
5. Utermohl, H. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 1958;9:1-38.

DETERMINAZIONE DEI BATTERIOFAGI ANTI-*ESCHERICHIA COLI*

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Batteriofagi anti-*Escherichia coli* rilevato con i metodi ISS A [008A rev. 00, 008B rev. 00; 008C rev. 00].

I batteriofagi, per le loro caratteristiche chimico-fisiche e biologiche simili a quelle dei virus animali, sono stati utilizzati come modello di studi sulle interazioni virus-cellula ospite. Sono costituiti da una molecola di acido nucleico racchiusa in un involucro protettivo proteico. Il Comitato Internazionale di tassonomia dei virus li ha classificati, in base alla loro morfologia, in 11 famiglie, andando da una morfologia estremamente semplice (Leviviridae) con capsidi icosaedrico con una sola proteina e una RNA-polimerasi associata all'RNA, ad una molto complicata (Myoviridae) con capsidi icosaedrico legato, tramite un anello, ad una coda contrattile.

I batteriofagi possono moltiplicarsi esclusivamente all'interno della cellula batterica ospite metabolicamente attiva e competente. Le loro modalità replicative non differiscono da quelle dei virus animali.

I dati riguardanti la distribuzione nell'ambiente dei fagi sono ancora frammentari ma è possibile individuare la loro presenza in tutte le matrici ambientali. Qualunque sia il loro habitat, esiste una popolazione fagica di batteri autoctoni e una popolazione fagica proveniente da altri ambienti. L'interesse maggiore è rivolto a questa seconda categoria di fagi. In particolare, per quanto concerne gli ambienti acquatici, le informazioni più importanti riguardano la presenza di fagi infettanti i batteri del genere *E. coli* (colifagi); ciò è dovuto all'interesse che essi ricoprono in qualità di indicatori potenziali di una contaminazione virale di origine fecale.

Lo studio della loro presenza nel tratto digerente dell'uomo e degli animali ha dimostrato che il 23,5% di campioni di feci umane contiene colifagi a una concentrazione pari a 10^5 Unità Formanti Placca (UFP) per grammo di feci.

Un aspetto importante è la capacità di moltiplicazione dei fagi nell'ambiente. I fagi infettanti i batteri autoctoni si replicano nell'ambiente in funzione della presenza del batterio ospite, dell'età fisiologica del batterio stesso e della densità rispettivamente del batterio ospite e del fago.

Per i fagi specifici dei batteri alloctoni invece, la situazione è meno chiara. Una moltiplicazione nell'ambiente è stata osservata per i colifagi somatici. Essi riconoscono il loro recettore di attacco sulla superficie esterna del corpo batterico, mentre i colifagi F-specifici utilizzano come recettore il sex-pilus. La ragione di tale fenomeno è intuibile per i colifagi somatici in quanto questi, allo stesso modo del loro batterio ospite, sono in grado di moltiplicarsi a temperature di circa 15°C quali quelle riscontrabili in ambienti idrici. I colifagi F-specifici possono infettare invece soltanto le cellule di *E. coli* che hanno sintetizzato il loro sex-pilus per produrre placche visibili (zone trasparenti) su un monostrato confluyente cresciuto in condizioni appropriate, tenendo conto che il processo di infezione è inibito in presenza di una concentrazione pari a 40 (occasionalmente 400) µg/mL di RNasi nel mezzo di coltura. La sintesi di questo recettore è possibile a temperature superiori a 30°C, ragion per cui è presumibile che la moltiplicazione nell'ambiente di questi fagi sia realizzabile soltanto se il loro batterio ospite ha sintetizzato precedentemente il sex-pilus nell'intestino degli omeotermi prima di essere sversato nel mezzo idrico.

Nelle acque destinate al consumo umano la presenza di batteriofagi è raramente riscontrata.

Nel Decreto legislativo 31/2001 e s.m.i. per questo parametro, inserito nell'Avvertenza, è prescritta l'assenza obbligatoria nell'acqua.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS A [008A rev. 00, 008B rev. 00; 008C rev. 00] vengono utilizzate per il rilevamento dei batteriofagi anti-*Escherichia coli* nelle acque da destinare e destinate al consumo umano.

2. Principio del metodo

Nonostante la normativa richieda soltanto una determinazione qualitativa della presenza di batteriofagi anti-*E. coli*, con i metodi di seguito descritti viene comunque data anche la possibilità di quantificarne, se presenti, il numero. Vengono pertanto proposti tre metodi, di cui due quantitativi: il metodo MPN (numero più probabile - Most Probable Number), il metodo del conteggio di placche di lisi su piastre di terreno agarizzato, e uno qualitativo di Presenza/Assenza.

L'esecuzione dei metodi ISS A [008A rev. 00, 008B rev. 00; 008C rev. 00] prevede obbligatoriamente, in fase preanalitica, la concentrazione del campione da analizzare che può essere effettuata come riportato in 5. o 6. Inoltre, quali batteri rivelatori sono da utilizzare quelli riportati in 4.1. da mantenere secondo 4.2.

3. Strumentazione e vetreria

Per effettuare l'analisi, oltre la normale strumentazione di base di laboratorio (Appendice) è necessario disporre di:

- spettrofotometro;
- agitatore basculante.

4. Volume da analizzare

Il volume da analizzare per poter effettuare una analisi batteriofagica dipende dalla natura del campione di acqua. Acque superficiali e acque potabilizzate presentano concentrazioni di batteriofagi sensibilmente differenti. Per lo svolgimento di analisi per la ricerca di batteriofagi, si consiglia il prelievo dei seguenti volumi di acqua, valori elaborati in base alla letteratura internazionale disponibile e sulla base dell'esperienza:

- acque superficiali: 0,1÷10 L
- acque sorgive: 10÷100 L
- acque di falda e potabilizzate: 100÷1000 L

Per i volumi più elevati, relativi ad acque presumibilmente poco contaminate, è necessario effettuare una preparazione del campione riducendo notevolmente il volume da esaminare mediante tecniche di concentrazione (filtrazione, ultrafiltrazione).

4.1. Batteri rivelatori raccomandati

E. coli C ATCC 13706 per la messa in evidenza dei colifagi somatici, ma è anche possibile utilizzare un batterio derivato da esso purché resistente all'acido nalidixico (7.2.1.). Quest'ultimo viene aggiunto all'Agar molle (7.1.3.) alla concentrazione finale di 100 mg/L.

Batterio derivato da *E. coli* K 12 Hfr (alta frequenza di ricombinazione - *High frequency recombination*) per la messa in evidenza dei colifagi F-plus, che presenta i plasmidi di resistenza per

la streptomina (7.2.2.) e l'ampicillina (7.2.3.). Questi vengono aggiunti all'Agar molle (7.1.3.) alla concentrazione di 15 mg/L.

4.2. Conservazione dei batteri rivelatori

Il batterio rivelatore raccomandato può essere conservato a (5 ± 3) °C per non più di una settimana in terreno solido di crescita (7.1.2.). Può essere conservato per lungo tempo a -70 °C in fiale in 2/3 di crescita batterica in terreno liquido (7.1.1.) e 1/3 di glicerolo anidro purissimo sterile.

5. Concentrazione. Metodo con membrane filtranti (MF)

5.1. Terreni

5.1.1. Estratto di carne al 3%, pH 9,5 (eluente)

Composizione	
Estratto di carne	3 g
Acqua distillata	100 mL
pH 9,5±0,2	

In una beuta sterile reidratare la polvere, provvedendo al completo scioglimento con l'aiuto di un agitatore magnetico. Portare il pH al valore desiderato con l'aggiunta di idrossido di sodio. Sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (121 ± 3) °C.

5.2. Filtri

5.2.1. Filtri elettronegativi

Questo modello di membrane filtranti presenta una superficie a carica elettrica negativa che ai valori di pH prossimi alla neutralità respinge le particelle virali. Riducendo i valori di pH del campione intorno a pH 3,5 si ottiene una inversione della carica elettrica superficiale dei virus che ne permette il loro adsorbimento. È possibile migliorare la capacità adsorbente del filtro aggiungendo cationi bi- o tri-valenti al campione da concentrare. Questa tecnica, largamente utilizzata per il recupero degli enterovirus da campioni ambientali, può essere applicata per il recupero dei batteriofagi ma con un minor rendimento; molti fagi infatti sono rapidamente inattivati dai bassi valori di pH. Adottando dei valori di pH leggermente più alti (da 3,8 a 4,0), ed effettuando un accurato controllo di esso durante le singole fasi della procedura di recupero, si ottengono risultati più soddisfacenti. Per valori di pH intorno a 6,0 e in presenza di ioni magnesio a concentrazione 0,2 M è stato dimostrato un maggior rendimento.

5.2.2. Filtri elettropositivi

Ottimo è l'adsorbimento dei fagi ai filtri con carica elettrica superficiale positiva, piuttosto difficile risulta invece la loro completa eluizione; adottando come eluente una soluzione di estratto di carne al 3% con un valore di pH 9,5 si ottengono risultati migliori.

5.3. Procedura di eluizione

Dopo aver filtrato il campione per pressione negativa attraverso il filtro, si procede alla eluizione con un piccolo volume (5 mL) di eluente (5.1.1.). Trasferire il filtro in un provettone contenente il volume

di eluente e agitare vigorosamente per 5 min. L'eluato viene neutralizzato velocemente con acido cloridrico e il concentrato ottenuto è pronto per essere analizzato.

5.4. Decontaminazione del campione

È necessario inattivare o eliminare la popolazione microbica eventualmente presente prima di effettuare la messa in evidenza dei fagi.

La decontaminazione può essere effettuata direttamente, mediante filtrazione su membrane (0,2 µm di porosità) a basso adsorbimento proteico preventivamente trattate con estratto di carne al 3%, pH 7,2 (6.1.1.) o indirettamente, nella fase di rilevazione dei fagi, aggiungendo al mezzo di coltura un antibiotico in grado di inattivare, anche parzialmente, i batteri contaminanti ma non la crescita del batterio rivelatore (4.1.).

La decontaminazione del campione con cloroformio è sconsigliata per i batteriofagi in quanto è stata dimostrata una loro inattivazione parziale.

5.4.1 Metodo diretto

Montare su una siringa sterile un filtro (0,2 µm di porosità) sterile a basso legame proteico (*low binding protein*). Prelevare 1-2 mL di estratto di carne sterile al 3%, pH 7,2 (6.1.1.) e lasciarlo passare attraverso il filtro. Successivamente filtrare il campione concentrato (eluato neutralizzato) raccogliendolo in una provetta sterile. Questa procedura va effettuata in condizioni di asepsi. Il campione è così pronto per essere seminato.

5.4.2. Metodo indiretto

Aggiungere al mezzo di coltura Agar Triptone molle (7.1.3.) gli antibiotici specifici per il tipo di fago da evidenziare (7.2.). Essi sono in grado di inattivare, seppur parzialmente, i batteri contaminanti, ma non la crescita del batterio rivelatore che presenta un plasmide di resistenza verso l'antibiotico.

6. Concentrazione.

Metodo per Ultrafiltrazione a Flusso tangenziale

L'ultrafiltrazione è un processo di separazione delle particelle in funzione del solo peso molecolare; esistono diverse membrane con tagli molecolari (*nominal molecular weight limit*) da 1.000 sino a 1.000.000 di dalton. La funzione delle membrane è quella di porre una barriera tra le sostanze che riescono ad attraversare le membrane e le altre, a peso molecolare più elevato rispetto al taglio molecolare (*cut-off*), che sono ritenute, ad esempio i virus. Nel caso specifico i batteriofagi vengono concentrati non per adsorbimento su membrane ma per riduzione progressiva del volume del campione dovuto a perdita di acqua, sali e soluti in base al *cut-off* scelto. Le membrane attualmente in commercio sono di due tipi: cellulosa rigenerata e polisulfone.

Si consiglia l'uso di membrane con taglio molecolare pari a 100.000 dalton.

6.1. Terreni

6.1.1. Estratto di carne al 3%, pH 7,2

Composizione	
Estratto di carne	3 g
Acqua distillata	100 mL
pH 7,2±0,1	

In una beuta sterile reidratare la polvere, provvedendo al completo scioglimento con l'aiuto di un agitatore magnetico. Sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (121 ± 3) °C. La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

6.1.2 Estratto di carne al 3%, pH 9,5 (5.1.1.)

6.1.3. Soluzione di Formaldeide allo 0,1%

Composizione		
Formaldeide	13,5	mL
Acqua distillata	500	mL

Preparare al momento dell'uso e scartarla dopo l'utilizzo.

6.1.4. Soluzione di Idrossido di sodio 0,1 N

Composizione		
Idrossido di sodio	4	mL
Acqua distillata	1	L

Agitare vigorosamente con barretta magnetica fino a completa dissoluzione. Scartare dopo l'utilizzo.

6.2. Procedura

Il campione non necessita di pretrattamenti sebbene, per migliorare il rendimento della cartuccia, è preferibile pretrattare le membrane con estratto di carne al 3%, pH 7,0 (6.1.1.) prevenendo così l'adsorbimento aspecifico dei virus alla membrana.

Montare la cartuccia secondo le istruzioni della casa produttrice.

Lavare la cartuccia con 5-10 L di acqua distillata al fine di allontanare il liquido conservante.

Pretrattare il sistema con estratto di carne a pH 7,0 (6.1.1.) facendolo ricircolare per 5 minuti.

Far circolare il campione alle seguenti condizioni operative: 10-12 psi in entrata.

Fermare l'apparecchio quando il recipiente del campione è quasi vuoto. In questo caso il volume del campione è rappresentato dal solo volume di riempimento dei tubi e di imbibizione della cartuccia. Svuotare il sistema completamente e raccogliere il campione.

Lavare la cartuccia con una soluzione di estratto di carne al 3%, pH 9,5 (5.1.1.), utilizzando un volume pari a 3/4 dell'ultraconcentrato.

Riunire l'ultraconcentrato con la soluzione di lavaggio.

Neutralizzare il pH del campione-concentrato finale con acido cloridrico.

Il campione può essere ulteriormente concentrato se necessario, utilizzando sistemi di ultrafiltrazione in grado di trattare volumi minori di acqua.

A fine concentrazione:

- lavare la cartuccia con 1-2 L di acqua distillata;
- far circolare in continuo per almeno 15 minuti una soluzione di sodio idrossido 0,1 N (6.1.4.);
- lavare la cartuccia con 2-3 L di acqua distillata.

A questo punto le cartucce possono essere utilizzate per un nuovo campione o conservate per successive analisi.

6.3. Mantenimento e conservazione delle cartucce

Le cartucce per ultrafiltrazione a flusso tangenziale possono essere utilizzate a lungo e per diversi campioni se adeguatamente rigenerate e conservate. Procedere nel seguente modo:

- lavare la cartuccia con 1-2 L di acqua distillata;
- far circolare in continuo per almeno 15 minuti una soluzione di sodio idrossido 0,1 N (6.1.4.);
- lavare la cartuccia con 2-3 L di acqua distillata;
- far circolare in continuo una soluzione di formaldeide allo 0,1% (6.1.3.); la formaldeide è una sostanza cancerogena. Osservare le specifiche misure di sicurezza o utilizzare un'alternativa idonea;

- spegnere la pompa ed estrarre la cartuccia cercando di conservare quanta più formaldeide possibile all'interno della cartuccia medesima;
- mantenerla a (5 ± 3) °C.

7. Rilevamento dei fagi.

Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN) - ISS A 008A rev. 00

Il metodo permette di fornire una stima, statisticamente probabile, della concentrazione di fagi in campioni di acque dove si presume una scarsa presenza di essi.

In pratica consiste nel mescolare il batterio rivelatore con volumi di campione appropriati, in una serie di tubi contenenti i terreni specifici.

Durante l'incubazione i fagi si moltiplicano in presenza del loro batterio ospite. Successivamente è necessario evidenziarli in ciascun tubo di coltura con la tecnica dello *spot test* (7.3.1.). Il numero di tubi positivi verrà confrontato nella tabella delle combinazioni (Tabelle 1a e 1b), e il risultato espresso secondo la formula di Thomas:

$$MPN / 100mL = \frac{N^\circ \text{ di tubi positivi} \times 100}{\sqrt{mL \text{ dicampione nei tubi negativi} \times mL \text{ di campione in tutti i tubi}}}$$

Tabella 1a. Valori dell'indice MPN e limiti di confidenza al 95% per 3 tubi di diluizione

Combinazioni di tubi positivi	3 tubi per diluizione		
	Indice mpn/100mL	Limiti di confidenza	
		inferiore	superiore
0-0-0	< 3		
0-0-1	3	< 0,5	9
0-1-0	3	< 0,5	13
0-2-0			
1-0-0	4	< 0,5	20
1-0-1	7	1	21
1-1-0	7	1	23
1-1-1	11	3	36
1-2-0	11	3	36
2-0-0	9	1	36
2-0-1	14	3	37
2-1-0	15	3	44
2-1-1	20	7	89
2-2-0	21	4	47
2-2-1	28	10	150
2-3-0			
3-0-0	23	4	120
3-0-1	39	7	130
3-0-2	64	15	380
3-1-0	43	7	210
3-1-1	75	14	230
3-1-2	120	30	380
3-2-0	93	15	380
3-2-1	150	30	440
3-2-2	210	35	470
3-3-0	240	36	1300
3-3-1	460	71	2400
3-3-2	1100	150	4800
3-3-3	≥2400		

Tabella 1b. Valori dell'indice MPN e limiti di confidenza al 95% per 5 tubi di diluizione

Combinazioni di tubi positivi	5 tubi per diluizione		
	Indice mpn/100mL	Limiti di confidenza	
		inferiore	superiore
0-0-0	< 2		
0-0-1	2	< 0,5	7
0-1-0	2	< 0,5	7
0-2-0	4	< 0,5	11
1-0-0	2	< 0,5	7
1-0-1	4	< 0,5	11
1-1-0	4	< 0,5	11
1-1-1	6	< 0,5	15
1-2-0	6	< 0,5	15
2-0-0	4	< 0,5	13
2-0-1	7	1	17
2-1-0	7	1	17
2-1-1	9	2	21
2-2-0	9	2	21
2-3-0	12	3	28
3-0-0	8	1	19
3-0-1	11	2	25
3-1-0	11	2	25
3-1-1	14	4	34
3-2-0	14	4	34
3-2-1	17	5	46
4-0-0	13	3	31
4-0-1	17	5	46
4-1-0	17	5	46
4-1-1	21	7	63
4-1-2	26	9	78
4-2-0	22	7	67
4-2-1	26	9	78
4-3-0	27	9	80
4-3-1	33	11	93
4-4-0	34	12	93
5-0-0	23	7	70
5-0-1	31	11	89
5-0-2	43	15	110
5-1-0	33	11	93
5-1-1	46	16	120
5-1-2	63	21	150
5-2-0	49	17	130
5-2-1	70	23	170
5-2-2	94	28	220
5-3-0	79	25	190
5-3-1	110	31	250
5-3-2	140	37	340
5-3-3	180	44	500
5-4-0	130	35	300
5-4-1	170	43	490
5-4-2	220	57	700
5-4-3	280	90	850
5-4-4	350	120	1000
5-5-0	240	68	750
5-5-1	350	120	1000
5-5-2	540	180	1400
5-5-3	920	300	3200
5-5-4	1600	640	5800
5-5-5	≥2400		

7.1. Reagenti e terreni di coltura

7.1.1. Brodo Triptone

Composizione	
Triptone	10 g
Destrosio	1 g
Cloruro di sodio	5 g
Acqua distillata	1 L
pH 7,0±0,2	

Sciogliere i costituenti in acqua distillata, sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per 15 minuti e mantenere a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Utilizzare non oltre i 14 giorni.

7.1.2. Agar triptone: primo strato

Composizione	
Triptone	10 g
Destrosio	1 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1 L
pH 7,0±0,2	

Reidratare in acqua distillata i costituenti, secondo la formula sopra riportata, fino a completo scioglimento in agitazione. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per 15 minuti, raffreddare a circa $(50 \pm 5) ^\circ\text{C}$ e distribuire in capsule Petri da 90 mm di diametro. Lasciare solidificare. Le piastre possono essere conservate per circa una settimana a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

7.1.3. Agar Triptone molle: secondo strato

Composizione	
Triptone	10 g
Destrosio	1 g
Cloruro di sodio	5 g
Agar	7 g
Acqua distillata	1 L
pH 7,0±0,2	

Preparare il terreno in piccoli matracci nella quantità sufficiente per l'analisi quotidiana e autoclavare a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Mantenere il terreno a $(50 \pm 5) ^\circ\text{C}$ fino al momento dell'uso.

Aggiungere prima della semina acido nalidixico (7.2.1.) alla concentrazione di 100 mg/L per la ricerca dei colifagi somatici; oppure streptomicina (7.2.2.) e ampicillina (7.2.3.) entrambi alla concentrazione di 15 mg/L per la ricerca dei fagi F-plus.

7.1.4. Soluzione tampone per fago

Composizione	
Fosfato di sodio bibasico	7 g
Fosfato di potassio monobasico	3 g
Sodio cloruro	5 g
Acqua distillata	1 L

Sciogliere i costituenti in acqua distillata e autoclavare a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Lasciare raffreddare e aggiungere:

Solfato di magnesio eptaidrato 0,1 M 10 mL (7.1.5.)

Cloruro di calcio biidrato 0,01 M 10 mL (7.1.6.)

Queste soluzioni vanno preparate separatamente, autoclavate a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ e conservate a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non oltre 6 mesi in condizioni ottimali.

7.1.5. Soluzione di Solfato di magnesio eptaidrato allo 0,1 M

Composizione	
Solfato di magnesio eptaidrato	2,46 g
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere la polvere in acqua fino alla completa dissoluzione, sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti e conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non oltre 6 mesi in condizioni ottimali.

7.1.6. Soluzione di Cloruro di calcio biidrato allo 0,0 1 M

Composizione	
Cloruro di calcio biidrato	0,15 g
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere la polvere in acqua fino alla completa dissoluzione, sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 min e conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non oltre 6 mesi in condizioni ottimali.

7.2. Supplementi selettivi: antibiotici

Gli antibiotici sono disponibili in commercio in forma liofilizzata.

Preparare uno *stock* iniziale per ogni antibiotico e conservarlo a $(-20 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Lo *stock* si conserva non oltre 6 mesi suddiviso in aliquote e in condizioni ottimali.

7.2.1. Acido nalidixico per la ricerca di Colifagi somatici: *stock* iniziale

Composizione	
Acido nalidixico	1 g
Acqua distillata	10 mL

Sciogliere l'antibiotico fino alla completa dissoluzione; sterilizzare per filtrazione. Dividere in aliquote da 1 mL. Conservare a $(-20 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.2.2. Streptomicina per la ricerca di Fagi F-plus: *stock* iniziale

Composizione	
Streptomicina	0,15 g
Acqua distillata	10 mL

Sciogliere l'antibiotico fino alla completa dissoluzione; sterilizzare per filtrazione. Dividere in aliquote da 1 mL. Conservare a $(-20 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.2.3. Ampicillina per la ricerca di Fagi F-plus: *stock* iniziale

Composizione	
Ampicillina	0,15 g
Acqua distillata	10 mL

Sciogliere l'antibiotico fino alla completa dissoluzione; sterilizzare per filtrazione. Dividere in aliquote da 1 mL. Conservare a $(-20 \pm 1)^\circ\text{C}$.

7.3. Procedura

Preparare un matraccio con 50 mL e 5 tubi contenenti ciascuno 10 mL di terreno liquido (7.1.1.), aggiungere 0,5 mL di una brodocoltura in fase esponenziale di crescita (densità ottica, D.O. = 0,3 a 620 nm) del batterio rivelatore (4.1.) nel matraccio e 0,1 mL per ciascun tubo.

Inoculare 50 mL del campione in esame nel matraccio e 10 mL in ciascun tubo.

Incubare sotto agitazione a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (20 ± 2) ore; prelevare 1 mL da ciascuna coltura, procedere con il metodo dello *spot test* (7.3.1.) per confermare la presenza dei fagi e calcolare il risultato consultando la tabella dell'MPN.

7.3.1. Spot test: conferma di positività

Preparare una capsula di Petri sterile da 90 mm di diametro con uno strato di terreno di crescita (7.1.2.) e lasciare solidificare. Mescolare 3 mL di agar molle (7.1.3.) portato a $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ in bagno termostato, con 0,2 mL di una brodocoltura del batterio rivelatore (4.1.) in fase esponenziale di crescita (D.O. = 0,3 a 620 nm) e, dopo lieve agitazione, versarlo velocemente sul primo strato agarizzato della capsula di Petri. Lasciare solidificare in piano. Prelevare una aliquota (circa 1 mL) della coltura ottenuta (matraccio e tubi) e procedere alla decontaminazione, per inattivare totalmente i batteri presenti, aggiungendo cloroformio pari ad 1/3 del volume dell'aliquota. Agitare vigorosamente per 5 minuti e centrifugare a 6000 rpm per 3 minuti. Raccogliere sterilmente il supernatante e deporre una goccia (50 μL) sulla superficie dell'agar. Lasciare asciugare e incubare per almeno (20 ± 2) ore a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$. In caso di presenza di fago si osserverà un'area di lisi intorno alla goccia depositata. È consigliabile affiancare sempre un controllo positivo utilizzando uno *stock* del fago precedentemente titolato alla concentrazione 10^5 UFP/mL.

7.4. Espressione dei risultati

Riportare il risultato come batteriofagi anti-*Escherichia coli* MPN/100 mL.

7.6. Controllo positivo: Stock del fago

Per preparare uno *stock* del fago è necessario disporre di almeno 5 piastre con lisi totale della crescita batterica ottenuta con il metodo delle placche di lisi (8.). Versare 3 mL di soluzione tampone del fago (7.1.4.) in ogni piastra coprendo tutta la superficie. Porre a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 1 ora le piastre e staccare l'agar molle utilizzando una spatola sterile. Con una pipetta raccogliere in una o più provette la soluzione tampone da ogni piastra e centrifugare a $(3000 \div 4000)$ rpm per 10 minuti. Recuperare il supernatante e filtrarlo sterilmente con filtri a basso adsorbimento proteico (*low binding protein*). Procedere alla titolazione del supernatante ottenuto e conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ lo *stock*. È consigliabile una titolazione mensile dello *stock* del fago (7.6.1.).

7.6.1. Titolazione dello stock del fago

Data l'alta concentrazione dello *stock* è necessario diluire. Allestire una serie di diluizioni in provette Eppendorf partendo da una diluizione di 10^{-1} fino a 10^{-9} dello *stock* usando la soluzione tampone del fago (7.1.4.) come diluente. Effettuare il test dalla diluizione 10^{-6} fino a 10^{-9} su piastre con il metodo delle placche di lisi (8.). È necessario affiancare un controllo della soluzione tampone e uno della crescita batterica:

controllo soluzione tampone:

Composizione	
Agar molle (7.1.3)	2,5 mL
Sospensione batterica (D.O. = 0,3) (4.1.)	0,5 mL
Soluzione tampone del fago (7.1.4.)	1 mL

controllo batterio:

Composizione	
Agar molle (7.2.3)	2,5 mL
Crescita batterica (D.O. = 0,3) (4.1.)	0,5 mL
Soluzione tampone del fago (7.2.4.)	1 mL

Da ogni diluizione seminare due piastre secondo il metodo descritto (8.) ed effettuare la conta delle placche di lisi dopo (20 ± 2) ore di incubazione a (36 ± 1) °C. Calcolare il titolo per mL.

8. Rilevamento dei fagi. Metodo delle placche di lisi - ISS A 008B rev. 00

Il metodo consiste nel mescolare un adeguato volume del campione da analizzare con un volume di agar molle (7.1.3.) mantenuto nella fase liquida (45 ± 1) °C, a cui viene aggiunta un'aliquota della sospensione batterica rivelatrice (4.1.). Dopo leggera agitazione la miscela ottenuta viene versata delicatamente su uno strato di terreno di crescita agarizzato (7.1.2.) precedentemente fatto solidificare in capsule Petri.

Dopo incubazione vengono osservate e quantizzate le placche di lisi: ognuna di queste corrisponde ad una particella di fago infettivo.

8.1. Reagenti e terreni di coltura

8.1.1. Brodo triptone (7.1.1.)

8.1.2. Agar triptone primo strato (7.1.2.)

8.1.3. Agar triptone molle (7.1.3.)

8.2. Procedura

In un tubo sterile mescolare:

2,5 mL di agar molle (7.1.3.) completo di antibiotici (7.2.), mantenuto in bagno termostato a (45 ± 1) °C, 0,5 mL di una coltura in fase esponenziale del batterio rivelatore (D.O. = 0,3 a 620 nm) (4.1.), 1 mL del campione da analizzare precedentemente concentrato (volume totale da seminare 5 mL di eluato da suddividere in 5 piastre).

Mescolare delicatamente e versare su un primo strato di terreno di crescita agarizzato (7.1.2.) solidificato in capsula Petri. Lasciare solidificare e incubare a (36 ± 1) °C.

Le placche di lisi sono visibili già dopo (6÷8) ore di permanenza a (36 ± 1) °C consentendo di effettuare una quantizzazione prima delle 24 ore. La lettura, comunque, può anche essere effettuata dopo (18÷24) ore.

8.3. Espressione dei risultati

Riportare il risultato come batteriofagi anti-*Escherichia coli* PFP/volume di campione concentrato.

9. Rilevamento dei fagi. Metodo qualitativo (presenza/assenza) - ISS A 008C rev. 00

Il metodo si basa su una fase di arricchimento del fago e sua successiva messa in evidenza aggiungendo al volume finale noto del campione da analizzare un egual volume di terreno di coltura idoneo nel quale è stato fatto precedentemente crescere il batterio rivelatore.

9.1. Reagenti e terreni di coltura

9.1.1. Brodo triptone (7.1.1.)

9.1.2. Brodo Triptone doppio concentrato (2x)

Composizione	
Triptone	20 g
Destrosio	2 g
Cloruro di sodio	10 g
Sodio cloruro	5 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±0,2	

Sciogliere i costituenti in acqua distillata, sterilizzare in autoclave per a (121 ± 3) °C per 15 minuti e mantenere a (5 ± 3) °C. Utilizzare non oltre i 14 giorni.

9.1.3. Agar triptone primo strato (7.1.2.)

9.1.4. Agar triptone molle (7.1.3.)

9.2. Procedura

In una bottiglia sterile di adeguata capacità mescolare:

- (a) il volume del campione di acqua concentrata da analizzare
- (b) un volume uguale di terreno liquido doppio concentrato (2x) (9.1.2.)
- (c) una coltura in fase esponenziale di crescita del batterio rivelatore (4.1.) in ragione del 12% della somma dei volumi suddetti (a + b).

Incubare a (36 ± 1) °C per (18 ± 2) ore in termostato. Dopo incubazione, una piccola quantità della coltura, preventivamente decontaminata, viene sottoposta al test di conferma (*spot test*) (7.3.1.).

9.3. Espressione dei risultati

Riportare il risultato come Presenza/Assenza di batteriofagi anti-*Escherichia coli* in un volume di campione concentrato.

Bibliografia

1. Debartolomeis J, Cabelli VJ. Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of F-male-specific bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 1991;57:1301-9.
2. Divizia M, Donia D, Gabrieli R, Ruscio V, Panà A. Valutazioni relative ad un nuovo sistema di ultrafiltrazione per la concentrazione di enterovirus e batteriofagi. *Ig Sanità Pubbl* 1997;53:315-20.
3. Donia D, Divizia M, Panà A. Analysis of concentration methods for bacteriophages. *Ig Moderna* 1998;109:1-8.
4. Havelaar AH. Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment. *ASM News* 1993;59:614-20.

DETERMINAZIONE DEI BATTERIOFAGI A RNA F-SPECIFICI

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Batteriofagi RNA F-specifici rilevato con il metodo ISS A 009A rev. 00.

I batteriofagi, per le loro caratteristiche chimico-fisiche e biologiche simili a quelle dei virus animali, sono stati utilizzati come modello di studi sulle interazioni virus-cellula ospite. Sono costituiti da una molecola di acido nucleico racchiusa in un involucro protettivo proteico. Il Comitato Internazionale di tassonomia dei virus li ha classificati, in base alla loro morfologia, in 11 famiglie, andando da una morfologia estremamente semplice (*Leviviridae*) con capsidi icosaedrico con una sola proteina e una RNA-polimerasi associata all'RNA, ad una molto complicata (*Myoviridae*) con capsidi icosaedrico legato, tramite un anello, ad una coda contrattile.

I batteriofagi possono moltiplicarsi esclusivamente all'interno della cellula batterica ospite metabolicamente attiva e competente. Le loro modalità replicative non differiscono da quelle dei virus animali. I dati riguardanti la distribuzione nell'ambiente dei fagi sono ancora frammentari ma è possibile individuare la loro presenza in tutte le matrici ambientali. Qualunque sia il loro habitat, esiste una popolazione fagica di batteri autoctoni e una popolazione fagica proveniente da altri ambienti. L'interesse maggiore è rivolto a questa seconda categoria di fagi. In particolare, per quanto concerne gli ambienti acquatici, le informazioni più importanti riguardano la presenza di fagi infettanti i batteri del genere *E. coli* (colifagi); ciò è dovuto all'interesse che essi ricoprono in qualità di indicatori potenziali di una contaminazione virale di origine fecale.

Lo studio della loro presenza nel tratto digerente dell'uomo e degli animali ha dimostrato che il 23,5% di campioni di feci umane contiene colifagi a una concentrazione pari a 10^5 Unità Formanti Placca (UFP) per grammo di feci.

Un aspetto importante è la capacità di moltiplicazione dei fagi nell'ambiente. I fagi infettanti i batteri autoctoni si replicano nell'ambiente in funzione della presenza del batterio ospite, dell'età fisiologica del batterio stesso e della densità rispettivamente del batterio ospite e del fago.

Per i fagi specifici dei batteri alloctoni invece, la situazione è meno chiara. Una moltiplicazione nell'ambiente è stata osservata sia per i colifagi somatici. Essi riconoscono il loro recettore di attacco sulla superficie esterna del corpo batterico mentre i colifagi F-specifici utilizzano come recettore il sex-pilus. La ragione di tale fenomeno è intuibile per i colifagi somatici in quanto questi, allo stesso modo del loro batterio ospite, sono in grado di moltiplicarsi a temperature di circa +15 °C quali quelle riscontrabili in ambienti idrici. I colifagi F-specifici possono infettare invece soltanto le cellule di *E. coli* che hanno sintetizzato il loro sex-pilus per produrre placche visibili (zone trasparenti) su un monostrato confluyente cresciuto in condizioni appropriate, tenendo conto che il processo di infezione è inibito in presenza di una concentrazione pari a 40 (occasionalmente 400) µg/mL di RNasi nel mezzo di coltura. La sintesi di questo recettore è possibile a temperature superiori a +30 °C, ragion per cui è presumibile che la moltiplicazione nell'ambiente di questi fagi sia realizzabile soltanto se il loro batterio ospite ha sintetizzato precedentemente il sex-pilus nell'intestino degli omeotermi prima di essere sversato nel mezzo idrico. I batteriofagi a RNA F-specifici sono batteriofagi costituiti da un semplice capsido a simmetria cubica tra 21 nm e 30 nm di diametro e il loro genoma è costituito da RNA a singola elica. Essi appartengono al gruppo morfologico E e sono classificati nella famiglia delle *Leviviridae*. La famiglia attualmente è formata da due generi: *Levivirus*, per il quale il fago MS2 è la specie tipica e *Allolevivirus*, per il quale Qβ è la specie tipica. Essi infettano i batteri che possiedono il plasmide F o plasmide sessuale in origine rilevato in *Escherichia coli* K12, e si adsorbono agli F-pili o pili sessuali codificati da questo plasmide. Il plasmide F è trasferibile ad una vasta gamma di batteri Gram negativi. Il processo di infezione è inibito dalla presenza di RNasi nel mezzo di coltura, che viene utilizzata per distinguere tra batteriofagi F-specifici a RNA e batteriofagi di forma bastoncellare F-specifici a DNA appartenenti alla famiglia *Inoviridae*.

La presenza di batteriofagi a RNA F-specifici in un campione di acqua generalmente indica inquinamento da acque di scarico contaminate da feci umane o animali. La loro sopravvivenza nell'ambiente, rimozione con i processi di trattamento delle acque più utilizzati e la concentrazione o ritenzione da parte di molluschi bivalvi è paragonabile a quella dei virus enterici umani trasmissibili da acque e alimenti, come ad esempio enterovirus, virus dell'epatite A e rotavirus. La determinazione del parametro non è prevista dal DL.vo 31/2001.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica ISS A 009A rev. 00 viene utilizzata per il rilevamento dei batteriofagi a RNA F-specifici nelle acque da destinare e destinate al consumo umano.

2. Principio del metodo

Il metodo di seguito riportato fa riferimento alla norma ISO 10705-1.

Il campione è mescolato in un volume ridotto di terreno nutritivo semisolido. Viene aggiunta la coltura del ceppo ospite e successivamente seminata su un terreno nutritivo solido. Dopo l'incubazione vengono lette le capsule seminate per verificare la presenza di placche visibili.

Se necessario, si procede con l'esame simultaneo di piastre in parallelo con l'aggiunta di RNasi per la conferma attraverso conteggi differenziali. I risultati sono espressi come concentrazione di particelle formanti placca (PFP) per unità di volume.

3. Misure di sicurezza

Il ceppo ospite da utilizzare è *Salmonella typhimurium* mutante di bassa patogenicità. Manipolare secondo le misure di sicurezza nazionali o internazionali relative a queste tipologie di batteri. I batteriofagi a RNA F-specifici non sono patogeni per l'uomo e per gli animali, ma sono molto resistenti all'essiccamento. Pertanto, adottare misure appropriate per prevenire cross-contaminazioni dei materiali di prova, in particolare quando si esaminano o si manipolano colture con titoli elevati o quando si inoculano colture dei ceppi ospite. Eseguire le procedure sotto cappa "biohazard" o in un'area separata del laboratorio.

4. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice) sono necessari:

- stufa a secco per la sterilizzazione con calore a secco e un'autoclave. Eccetto per il materiale fornito sterile, la vetreria e altri materiali dovrebbero essere sterilizzati in accordo con la ISO 8199,
- termostato o bagnomaria alla temperatura di $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- termostato o bagnomaria alla temperatura di $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$, dotati di una piattaforma rotante a $100/\text{min} \pm 10/\text{min}$;
- bagnomaria alla temperatura di $(44 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- bagnomaria o apparecchiatura equivalente;
- pH-metro;
- apparecchiatura per il conteggio, con luce obliqua indiretta;
- congelatore a $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$;

- congelatore a $(-70^{\circ} \pm 10)$ °C;
- spettrofotometro in grado di ospitare cuvette da 1 cm o il braccio laterale di una beuta nefelometria, dotati di un filtro nel range da 500 nm a 650 nm con un massimo di lunghezza d'onda di ± 10 nm;
- capsule di Petri, di 9 cm o 15 cm di diametro;
- pipette graduate da 1 mL, 5 mL e 10 mL;
- bottiglie di vetro, di volumi appropriati;
- provette;
- cilindri graduati di capacità adeguata;
- beute da 250 mL a 300 mL, con tappi di cotone o valide alternative;
- cuvette di 1 cm di cammino ottico o una beuta nefelometrica di capacità da 250 a 300 mL, con un braccio laterale cilindrico che possa essere posizionata nello spettrofotometro e con un tappo di cotone o una valida alternativa;
- filtri a membrana con porosità nominale 0,2 μm , per la sterilizzazione;
- tubi di plastica sterili con cappuccio da 1,5 mL a 2 mL.

5. Diluenti, terreni di coltura e reagenti

5.1. Materiali di base

Utilizzare per la preparazione di terreni di coltura e reagenti ingredienti con caratteristiche omogenee di qualità e grado di purezza chimica. In alternativa, utilizzare terreni completi disidratati e seguire fedelmente le istruzioni del produttore per la preparazione.

Per la preparazione dei terreni, utilizzare acqua distillata o deionizzata priva di sostanze che possano inibire, nelle condizioni di prova, la crescita batterica.

5.2. Diluente

Per effettuare le diluizioni del campione, utilizzare una soluzione salina peptonata (5.3.8).

5.3. Terreni di coltura

5.3.1. Terreno di base

5.3.1.1. Brodo Triptone – Estratto di lievito – glucosio (TYGB)

Composizione		
Trypticase peptone	10	g
Estratto di lievito	1	g
Sodio cloruro	8	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2 \pm 0,1		

Sciogliere gli ingredienti in acqua calda. Distribuire 200 mL di terreno nelle bottiglie e sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Conservare al buio alla temperatura di (5 ± 3) °C per non più di 6 mesi.

5.3.1.2. Soluzione Calcio-glucosio

Composizione		
Glucosio	10	g
Cloruro di calcio biidrato	3	g
Acqua distillata	1000	mL

Sciogliere gli ingredienti in acqua. Raffreddare a temperatura ambiente e sterilizzare per filtrazione attraverso una membrana filtrante di porosità nominale pari a 0,22 µm. Conservare al buio a (5 ± 3) °C per non più di 6 mesi.

5.3.1.3. Terreno completo

Composizione	
Terreno di base	200 g
Soluzione di calcio-glucosio	2 g

Aggiungere sterilmente la soluzione calcio-glucosio al terreno di base e mescolare bene. Se non lo si utilizza immediatamente, conservarlo al buio a (5 ± 3) °C per non più di 6 mesi.

5.3.2. Agar Triptone – Estratto di lievito – glucosio (TYGA)

5.3.2.1. Terreno di base

Composizione	
Trypticase peptone	10 g
Estratto di lievito	1 g
Sodio cloruro	8 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,2 ±0,1	

Sciogliere gli ingredienti in acqua bollente. Distribuire 200 mL di terreno nelle bottiglie e sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Conservare al buio alla temperatura di (5 ± 3) °C per non più di 6 mesi.

5.3.2.2. Soluzione Calcio-glucosio

Composizione	
Glucosio	10 g
Cloruro di calcio biidrato	3 g
Acqua distillata	1000 mL

Sciogliere gli ingredienti in acqua. Raffreddare a temperatura ambiente e sterilizzare per filtrazione attraverso una membrana filtrante di porosità nominale pari a 0,22 µm. Conservare al buio a (5 ± 3) °C per non più di 6 mesi.

5.3.2.3. Terreno completo

Composizione	
Terreno di base	200 g
Soluzione di calcio-glucosio	2 g

Sciogliere il terreno di base e raffreddarlo tra (45 ÷ 50) °C. Sterilmente aggiungere la soluzione calcio-glucosio, mischiare bene e distribuire in capsule di Petri come riportato di seguito:

20 mL in piastre di 9 cm di diametro

50 mL in piastre di 14 cm di diametro

Consentire la solidificazione e conservare al buio alla temperatura di (5 ± 3) °C per non più di 6 mesi, se ben protette dall'essiccamento.

5.3.3. Agar Triptone - Estratto di lievito - glucosio semi-solido (ssTYGA)

Preparare il terreno di base (5.3.2.1.), ma utilizzando metà volume di agar (da 6 g a 10 g), a seconda della consistenza del terreno; la consistenza del ssTYGA è critica per l'ottenimento di buoni risultati

e, se possibile, dovrebbero essere testate diverse concentrazioni. Distribuire 50 mL in bottiglie (o altri contenitori idonei).

5.3.4. Soluzione di acido nalidixico

Composizione		
Acido nalidixico	250	mg
Sodio idrossido (1mol/L)	2	mL
Acqua distillata	8	mL

Sciogliere l'acido nalidixico nella soluzione di NaOH, aggiungere acqua distillata e miscelare accuratamente. Sterilizzare per filtrazione attraverso una membrana da 0,22 μ m. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di 8 ore o a (-20 ± 2) °C per non più di 6 mesi.

5.3.5. Soluzione di RNasi

Composizione		
RNasi	100	mg
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere l'RNasi in acqua riscaldandola per 10 minuti a 100 °C. Distribuire 0,5 mL di questa soluzione in provette e conservarle a (-20 ± 2) °C per non più di 1 anno. Scongelare a temperatura ambiente prima dell'uso.

5.3.6. Glicerolo

Composizione		
Glicerolo (870 g/L)	100	mL

Distribuire 20 mL in bottiglie e sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Conservare al buio per non più di 1 anno.

5.3.7. McConkey agar

Composizione		
Peptone	20	g
Lattosio	10	g
Sali biliari	5	g
Rosso neutro	75	mg
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4 \pm 0,1		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata secondo le istruzioni della ditta produttrice. Distribuire 200 mL di terreno in bottiglie e sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Raffreddare a $(45 \div 50)$ °C e distribuire 20 mL in capsule di Petri di 9 cm di diametro. Conservare al buio (5 ± 3) °C per non più di 6 mesi.

5.3.8. Soluzione peptonata salina

Composizione		
Peptone	1	g
Sodio cloruro	8,5	g
Acqua distillata	1000	mL

Sciogliere i costituenti in circa 950 mL di acqua in ebollizione. Aggiustare il pH con soluzione di idrossido di sodio o acido cloridrico (1 mol/L), affinché dopo la sterilizzazione sia $(7,0 \pm 0,1)$. Portare

a 1000 mL con acqua, dispensare in adeguati volumi e sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare al buio per non più di 6 mesi.

5.4. Reagenti

5.4.1. RNasi derivata da pancreas bovino

Attività specifica approssimativamente 50 unità/mg.

5.4.2. Dischi di antibiotico

Per il controllo della suscettibilità all'acido nalidixico (130 µg; 9 mm) e alla kanamicina (100 µg; 9 mm).

5.5. Colture microbiche di riferimento

Salmonella typhimurium ceppo WG49, fago tipo 3, Nalr (F' 42 lac::Tn5), NCTC 12484.

Batteriofago MS2, NCTC 12487 o ATCC 15597-B1.

Escherichia coli K-12 Hfr da appropriata collezione culturale, ovvero NCTC 12486 o ATCC 23631.

In alternativa a quelle proposte, utilizzare comunque colture di riferimento certificate.

6. Preparazione del materiale di prova

6.1 Crescita e mantenimento dei ceppi ospite WG49 e E. coli K12 Hfr

La crescita e il mantenimento dei ceppi ospite comprende diversi passaggi che sono riassunti nella Figura 1.

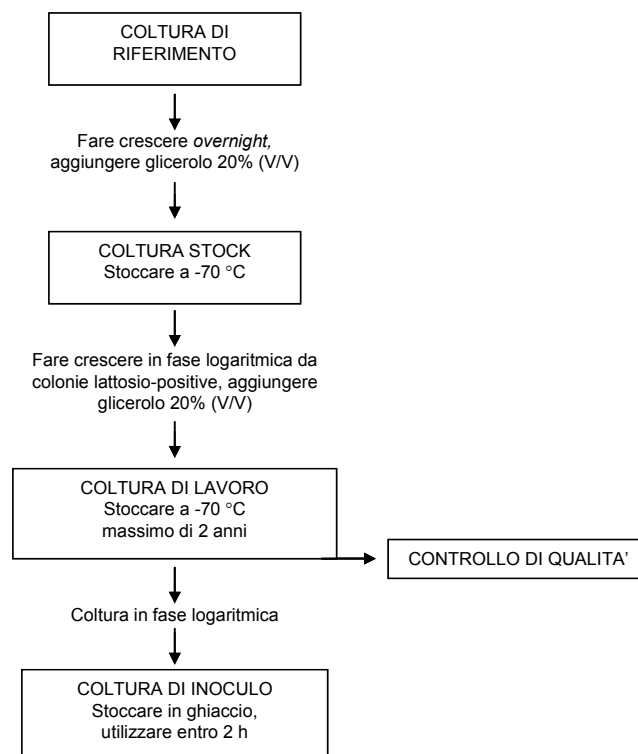


Figura 1. Schema dei passaggi per la crescita e il mantenimento dei ceppi ospite

6.1.1 Preparazione della coltura stock

Risospendere il contenuto di una provetta contenente la coltura di riferimento liofilizzata dei ceppi ospiti in un piccolo volume di TYGB (5.3.1.3.) utilizzando una pipetta Pasteur. Trasferire la sospensione in 50 mL di TYGB in una beuta da 300 mL. Incubare per (18 ± 2) ore a (36 ± 1) °C in agitazione a (100 ± 10) /minuto. Aggiungere 10 mL di glicerolo (5.3.6.) e mescolare bene. Aliquotare 1,2 mL in provette di plastica sterili e conservare a (-70 ± 10) °C.

6.1.2 Preparazione delle colture di lavoro

Sciogliere a temperatura ambiente una provetta della coltura *stock* (6.1.1) e inocularla su una piastra di McConkey agar (5.3.7.), o su un altro terreno contenente lattosio, in modo tale da ottenere colonie isolate. Incubare a (36 ± 1) °C per (18 ± 2) ore. Aggiungere 50 mL di TYGB (5.3.1.3.) ad una beuta da 300 mL e portare a temperatura ambiente. Selezionare 3 o 5 colonie lattosio-positive dal McConkey agar e inocularle nella beuta contenente il TYGB. Incubare per (5 ± 1) ore a (36 ± 1) °C in agitazione per (100 ± 10) /min. Aggiungere 10 mL di glicerolo (5.3.6.) e mescolare bene. Aliquotare 1,2 mL in provette di plastica sterili e conservare a (-70 ± 10) °C per un massimo di 2 anni. Eseguire il controllo di qualità delle colture di lavoro secondo la procedura 6.3.

Se ci si aspetta un elevato numero di prove, più beute possono essere inoculate in parallelo.

Se fallisce il controllo di qualità, preparare un nuovo inoculo dalla coltura *stock*. Dopo un secondo fallimento, o se la coltura *stock* non cresce, ordinare una nuova ampolla liofilizzata della coltura di riferimento.

Non eseguire ripetutamente subcolture in laboratorio.

6.2. Calibrazione delle misure di torbidità (curva di crescita)

Prendere una provetta della coltura di lavoro del ceppo ospite WG49 dal congelatore e scioglierla a temperatura ambiente. Aggiungere 50 mL di TYGB (5.3.1.3.), ad una beuta nefelometrica, portare a temperatura ambiente, impostare la lettura spettrofotometrica a 0 sul braccio laterale riempito. In alternativa, utilizzare una beuta e impostare la lettura spettrofotometrica a 0 sul brodo trasferito in una cuvetta. Inoculare 0,5 mL di coltura di lavoro. Incubare a (36 ± 1) °C in agitazione a (100 ± 10) /minuto per non più di 3 ore. Ogni 30 minuti misurare la torbidità e prelevare un campione di 1 mL per i conteggi su piastra, assicurandosi di lasciare la beuta fuori dal termostato meno tempo possibile. Diluire i campioni fino a 10^{-6} e seminare in doppio, per spatolamento 0,1 mL delle diluizioni 10^{-4} , 10^{-5} , e 10^{-6} su piastre di TYGA (5.3.2.3); incubare a (36 ± 1) °C per (24 ± 2) ore. Contare il numero totale di colonie su ciascuna piastra considerando le piastre con conteggi compresi tra 30 e 300 e calcolare il numero di CFP/mL.

Questa procedura dovrebbe essere effettuata diverse volte per stabilire la relazione tra la misurazione della torbidità e il conteggio delle colonie. Se sono stati ottenuti dati sufficienti, il lavoro futuro può essere basato esclusivamente sulla misurazione della torbidità.

6.3 Controllo di qualità del ceppo ospite WG49

Utilizzare una coltura preparata come al punto 6.2.

Al tempo $t = 0$ e $t = 3$ ore, inoculare anche due piastre di McConkey agar (5.3.7.) o un altro terreno contenente lattosio, con la stessa serie di diluizioni e incubare a (36 ± 1) °C per (24 ± 2) ore. Sulle piastre su cui sono cresciute tra 30 e 300 colonie, contare il numero di colonie lattosio-positive e lattosio-negative e calcolare la percentuale di colonie lattosio-negative.

Al tempo $t = 0$ e $t = 3$ ore, seminare per spatolamento 0,1 mL della diluizione 10^{-2} su una piastra di McConkey agar o, in alternativa, porre sulle piastre un disco con acido nalidixico (Nal) e uno con Kanamicina (Km) e incubare per (24 ± 2) ore a (36 ± 1) °C.

Misurare l'alone di inibizione attorno ai dischi di antibiotico. Possono essere utilizzati dischi di antibiotico con diametro o concentrazione diversi; in questo caso deve essere adottato un altro criterio per definire il massimo alone di inibizione.

Il ceppo ospite è accettabile se risponde ai seguenti criteri:

- conteggio su TYGA (5.2) a 0 ore: da $0,5$ a 3×10^7 CFP/mL;
- conteggio su TYGA (5.2) a 3 ore: da 7 a 40×10^7 CFP/mL;
- colonie lattosio-negative (segregazione del plasmide) $< 8\%$;
- alone di inibizione attorno al disco di acido nalidixico: assente;
- alone di inibizione attorno al disco di Kanamicina: < 20 mm di diametro.

Testare la sensibilità del ceppo ospite all'infezione da parte dei batteriofagi a RNA F-specifici seguendo la procedura sottoindicata.

Preparare una coltura *stock* del batteriofago MS2 come descritto nella nota A e conservarla a (5 ± 3) °C. Preparare serie di diluizioni decimali e seminarle come descritto al punto 6.1; utilizzare il ceppo ospite *E. coli* K-12 Hfr. Conservare le serie di diluizioni a (5 ± 3) °C overnight. Contare il numero di placche, dalle serie di diluizioni e preparare da 100 mL a 1000 mL di una sospensione di MS2 in soluzione salina peptonata (5.3.8.) che si presume contenga circa 100 PFP/mL. Aggiungere glicerolo (5g/L).

Aliquotare 1,2 mL in provette di plastica e conservarle a (-20 ± 5) °C o (-70 ± 5) °C.

Sciogliere 4 provette a temperatura ambiente, unire il contenuto in un'unica provetta e seminare 1 mL in doppio sul ceppo di *E. coli* K-12 Hfr e sul ceppo di WG49 come descritto al punto 6.1. Contare il numero di placche su ciascuna capsula e calcolare il recupero su WG49 rispetto al ceppo di *E. coli*. Accettare WG49 se il recupero è $> 80\%$.

7. Procedura

7.1 Procedura standard

Prelevare i campioni e recapitarli al laboratorio in accordo con le specifiche procedure.

Prendere una provetta di coltura di lavoro dal freezer e scioglierla a temperatura ambiente. Mettere 50 mL di TYGB (5.3.1.3), in una beuta nefelometrica, o in una beuta normale. Impostare la lettura dello spettrofotometro a 0 (6.2) e pre-riscaldare a temperatura ambiente. Inoculare 0,5 mL di coltura di lavoro. Incubare a (36 ± 1) °C in agitazione a (100 ± 10) /minuto. Ogni 30 minuti misurare la torbidità. Ad una torbidità corrispondente a una densità di cellule batteriche pari a circa 10^8 CFU/mL (basata sui dati ottenuti al punto 6.2) tirare fuori la coltura di inoculo dall'incubatore e raffreddarla velocemente in ghiaccio. Utilizzare entro 2ore.

È essenziale che la coltura sia raffreddata velocemente per prevenire la perdita degli F-pili da parte delle cellule batteriche che influenzerebbe negativamente il recupero.

Sciogliere le bottiglie di ssTYGA (5.3.3.), raffreddarle a (45 ± 5) °C, aggiungere sterilmente la soluzione di Ca-glucosio (5.3.2.2.) (0,5/50mL) e distribuire aliquote di 2,5 mL in provette di coltura con il tappo, mantenendole a bagnomaria a (45 ± 1) °C. Ad ogni provetta aggiungere 1 mL di campione (o diluito o concentrato). Eseguire ciascuna semina almeno in doppio. Assicurarsi che le provette inoculate non rimangano nel bagnomaria per più di 10 minuti.

Aggiungere 1 mL di coltura di inoculo, mescolare accuratamente e versare il contenuto sulla superficie di una capsula di TYGA (5.3.2.3) di 9 cm. Distribuire uniformemente, consentire la solidificazione su una superficie fresca e perfettamente orizzontale, e incubare le capsule a (36 ± 1) °C per (18 ± 2) ore.

Contare il numero di placche che compaiono su ciascuna piastra entro 4 ore, utilizzando una luce indiretta obliqua.

7.2. Metodo per campioni con una elevata flora microbica

Aggiungere acido nalidixico al ssTYGA (5.3.3.) fino ad ottenere una concentrazione finale di 100 µg/mL.

L'acido nalidixico è stabile al calore. Può essere aggiunto sia da una soluzione sterilizzata attraverso filtrazione (0,2 mL/50 mL) dopo aver sciolto l'ssTYGA, sia al TYGA prima della sterilizzazione.

7.3. Prova di conferma

In parallelo con la serie di capsule descritte al punto 6.1, preparare una serie simile aggiungendo la soluzione di RNasi (5.3.5) ai tubi di ssTYGA fino ad ottenere una concentrazione finale di 40 µg/mL (100 µL di soluzione di RNasi a 2,5 mL di ssTYGA in una provetta).

In casi rari, i fagi a RNA possono non essere inibiti dall'RNasi alla concentrazione di 40 µg/mL e può essere necessario aumentare la concentrazione a 400 µg/mL.

7.4 Campioni con un basso numero di fagi

Procedere come descritto al punto 6.1 ma con le seguenti modifiche:

10 mL di ssTYGA, 1 mL di coltura del ceppo ospite e 5 mL di campione in doppio per livello di diluizione; versare 50 mL di TYGA in una capsula di Petri da 14 cm.

Questa procedura consente di rilevare fino a 1 PFU/50 mL o 100 mL se 10 o 20 capsule sono inoculate in parallelo. A causa dell'elevato consumo di terreno di coltura, può essere consigliabile utilizzare metodi di concentrazione, quando necessario, per conteggi ancora più bassi.

7.5 Controllo di qualità

Con ciascuna serie di campioni, analizzare un campione negativo (bianco) utilizzando il diluente sterile e una preparazione standard di MS2 (6.3). Registrare i risultati su una carta di controllo.

Facoltativamente, utilizzare un campione standard naturalmente contaminato, proveniente da uno scarico o da acqua superficiale, diluito ad approssimativamente 100 PFP/mL con soluzione salina peptonata e glicerolo (5 g/L) e conservato a (-20 ± 5) °C o (-70 ± 5) °C. Smaltire il campione standard se la concentrazione di fagi a RNA diminuisce.

In mancanza di materiali di riferimento standardizzati facilmente reperibili, deve essere incoraggiato ogni programma di scambio di campioni standard tra laboratori.

Se la sensibilità ai fagi viene persa (questo è un fenomeno insolito, ma può accadere in modo estremamente improvviso e totale), preparare un nuovo set di inoculi come descritto al punto 6.1.2.

8. Espressione dei risultati

Selezionare le capsule con un numero di placche compreso tra 30 e 300. Dal numero di placche contate e tenendo conto del risultato delle precedenti prove di conferma, calcolare il valore di concentrazione di (particelle formanti placca di) batteriofagi a RNA F-specifici in 1 mL del campione come di seguito riportato:

$$PFP = X F \frac{N - N_{RNasi}}{n}$$

dove:

- PFP* valore di concentrazione confermato di batteriofagi a RNA F-specifici in un millilitro
- N* numero totale di placche contate sulle piastre di WG49 come riportato ai punti 6.1, 6.2 o 6.4;
- N_{RNasi}* numero totale di placche contate sulle piastre di WG49 addizionate di RNasi come riportato al punto 6.3;
- n* numero di replicati;
- F* fattore di diluizione (o concentrazione) (1/5 nel caso del punto 7.4).

9. Rapporto di prova

Il rapporto di prova dovrebbe contenere le seguenti informazioni:

- tutte le informazioni necessarie per la completa identificazione del campione;
- se è stata utilizzata una prova di conferma e il rapporto tra NRNasi e N, come percentuale;
- i risultati ottenuti espressi secondo le indicazioni di cui al punto 8;
- ogni altra informazione rilevante per il metodo.

NOTA A - Crescita del batteriofago MS2

Utilizzare le procedure standard per la propagazione fagica come descritte in letteratura.

Di seguito si riporta un esempio di una procedura che ha fornito buoni risultati.

Mettere 25 mL di TYGB in una beuta da 300 mL e inocularli con un appropriato ceppo ospite (ad es., *E. coli* K-12 Hfr, NCTC 12486). Incubare per (18 ± 2) ore a (36 ± 1) °C in agitazione a (100 ± 10) /minuto.

Pre-riscaldare a $(35 \div 37)$ °C 25 mL di TYGB in una beuta da 300 mL e inocularli con 0,25 mL della coltura overnight.

Incubarla per circa 90 minuti. Aggiungere MS2 da una soluzione *stock* fino ad una concentrazione finale di 10^7 PFP/mL.

Incubare per circa $(4 \div 5)$ ore. Aggiungere 2,5 mL di cloroformio (CHCl_3), mescolare bene e porla overnight a (5 ± 3) °C. Il cloroformio è una sostanza cancerogena. Osservare le specifiche misure di sicurezza o utilizzare una idonea alternativa.

Decantare la fase acquosa in provette e centrifugare ad una velocità minima di 3000 g per 20 minuti.

Aspirare con la pipetta il soprannatante facendo attenzione e stoccare a (5 ± 3) °C.

Il titolo della sospensione fagica dovrebbe essere attorno a 10^{10} PFP/mL e potrebbe raggiungere 10^{13} PFP/mL. In alcuni casi, potrebbe essere necessario ripetere il ciclo per ottenere un titolo sufficientemente elevato; può essere utilizzato un inoculo fagico più elevato.

Il titolo della sospensione fagica *stock* diminuisce lentamente nel tempo.

Bibliografia

1. ISO 10705-1. *Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages. Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages*. International Organization for Standardization; 1995.

DETERMINAZIONE DEI NEMATODI A VITA LIBERA

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Nematodi a vita libera rilevato con i metodi ISS A [010A rev. 00; 010B rev. 00].

I Nematodi a vita libera hanno diffusione cosmopolita e sono vermi di forma cilindrica, dal caratteristico movimento “a frusta” che comprendono sia forme parassite degli animali, dell’uomo e dei vegetali, sia forme a vita libera ad habitat idrico, viventi in acqua dolce o marina, e forme libere che colonizzano il suolo. Sono invertebrati senza appendici, con corpo posteriormente allungato in una coda, provvisti di una cuticola, per lo più liscia e trasparente. I sessi sono generalmente separati; alcuni sono ermafroditi o partenogenetici. Il loro ciclo vitale comprende lo stadio di uovo, 4 stadi larvali e uno stadio adulto. Morfologicamente gli stadi larvali sono simili a quello degli adulti, ma di dimensioni più piccole.

Sono animali strettamente bentonici e mancano nel plancton; tuttavia possono trovarsi temporaneamente sospesi nelle acque correnti dei fiumi e dei laghi e quindi anche in acque grezze da utilizzarsi a scopo potabile. A causa della loro attività motoria e per la loro nota resistenza alla disinfezione e ai trattamenti convenzionali di potabilizzazione, compresa la filtrazione a sabbia e con filtri di terra di diatomee, possono entrare nei sistemi di distribuzione dell’acqua e insediarsi nelle tubature. Inoltre è possibile trovarli anche in acque di rete provenienti da captazioni profonde, perché in grado di vivere anche nelle acque sotterranee, nelle grotte e nelle sorgenti.

Il parametro, inserito tra quelli indicati nell’Avvertenza dell’Allegato I del DL.vo n. 31 del 2001 e successive modifiche e integrazioni, ha una rilevanza legata prevalentemente alla verifica dell’efficacia del trattamento a cui sono soggette le acque e va interpretato come indicatore di qualità. La presenza di Nematodi a vita libera nelle acque in distribuzione è ammessa, ma ne è auspicabile l’assenza. Il volume di riferimento, equivalente al volume minimo da analizzare, è pari a 1 litro.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS A [010A rev. 00; 010B rev. 00] vengono utilizzate per la determinazione di Nematodi a vita libera nelle acque da destinare e destinate al consumo umano e nelle acque di piscina.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo - ISS A 010A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Nonostante la normativa richieda soltanto una determinazione qualitativa della presenza dei Nematodi a vita libera nelle acque destinate al consumo umano, con il metodo di seguito presentato viene data la possibilità di quantificare gli organismi, se presenti.

La tecnica, derivata dal metodo di Utermohl, prevede l’enumerazione dei Nematodi tramite osservazione diretta al microscopio ottico invertito dopo sedimentazione in apposite camere di vetro con fondo quadrettato per fotoincisione. In questo modo è assicurata l’osservazione di un campione inalterato dato che il materiale particolato in esso contenuto viene osservato direttamente dopo un solo passaggio di sedimentazione spontanea. Viene, peraltro, contestualmente consentita la valutazione

microscopica e macroscopica delle caratteristiche morfologiche di qualità complessiva del preparato, le quali vengono registrate nel referto analitico. È altresì possibile l'enumerazione distinta degli individui vivi e morti.

Il metodo è applicabile ad acque a vario grado di contaminazione previo utilizzo del volume di campione e della vetreria adeguati al caso in esame.

Durante l'esecuzione di questo metodo, non è infrequente osservare altre forme di metazoi piuttosto comuni nelle acque superficiali, come Rotiferi, Gastrotrichi, Tardigradi, Briozoi e alcune Classi di Crostacei (Fillopodi, Ostracodi e Copepodi), che è possibile enumerare analogamente ai Nematodi durante l'osservazione del preparato. Possono essere osservati anche altri reperti, come uova, larve di insetti, semi, pollini e varie strutture circolari riconducibili difficilmente a organismi definiti, anche perché tutte le membrane in disgregazione assumono la forma circolare.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice) è necessario avere a disposizione:

- Camere di sedimentazione
- Coperchi per le camere di sedimentazione (capsule Petri in vetro o in plastica del diametro opportuno)
- Microscopio ottico invertito con obiettivi 4x, 10x, 20x, 40x, 60x
- Micrometro oculare
- Stufa

Indicativamente si possono utilizzare camere di sedimentazione in vetro della capacità di 500 mL, di forma cilindrica e altezza di 95 mm, con base quadrettata per fotoincisione (dimensione quadretti 1 mm x 1 mm, area osservabile 0,9216 mm² per ciascun quadrato escludendo le aree coperte dai bordi dei quadretti) di diametro 95 mm e area di base totale osservabile di 7084,625 mm².

Tuttavia, la scelta delle camere può anche essere dettata dalla specifica esperienza dell'operatore.

La scelta della capacità maggiore o minore delle camere è dettata rispettivamente dalla maggiore o minore presunta presenza numerica dei Nematodi nel campione esaminato.

2.1.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 1 L, può essere esaminato in due aliquote da 500 mL ciascuna per campioni di acque a basso grado di contaminazione (acque finali, distribuite, fasi intermedie del trattamento di potabilizzazione).

2.1.4. Reagenti e prodotti di consumo

2.1.4.1. Soluzione disinfettante

Possono essere utilizzati detergenti tipo Desogen o Citrosil al 3% in acqua per la disinfezione degli oculari del microscopio e delle camere di sedimentazione.

2.1.4.2. Detergente

Detergente cremoso non abrasivo per evitare di graffiare il fondo fotoinciso della camera di sedimentazione.

2.1.4.3. Accessori

Spugnetta non abrasiva e carta assorbente.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Campionamento

Prelevare 1 L di acqua in bottiglie di vetro pulite e asciutte, non necessariamente sterili; in ogni caso è necessario evitare bottiglie contenenti tiosolfato di sodio per la neutralizzazione del cloro residuo libero.

La manipolazione di campioni per analisi biologiche, in generale, può esporre l'operatore a rischi per la salute; si raccomanda di seguire le procedure della buona pratica di laboratorio e le norme di sicurezza previste dalla legislazione.

2.1.5.2. Preparazione del campione a fresco

Agitare accuratamente il campione e versare il volume di campione nel cilindro della camera di sedimentazione mantenendolo, coperto, per un periodo minimo di 4 ore e non superiore alle 24 ore. In questo modo tutto il materiale eventualmente presente nel campione risulterà inalterato e chiaramente visibile sul fondo.

2.1.5.3. Centatura del microscopio

Per il conteggio degli organismi viene utilizzato il microscopio ottico invertito.

Per maggiore precisione, si descrive la procedura corretta per la centatura del microscopio. L'operazione consiste nel mettere a fuoco e centrare il condensatore in modo che la luce che lo attraversa formi l'immagine nella giusta posizione sopra il preparato; in questo modo si ottengono le migliori condizioni di risoluzione e di contrasto. In teoria l'operazione sarebbe da ripetere ad ogni cambio di obiettivo e/o di oculare, ma in pratica è consigliabile eseguirla periodicamente, per mantenere nel tempo le stesse condizioni di lavoro. La procedura prevede le seguenti fasi:

- mettere a fuoco il preparato con l'obiettivo 10x;
- chiudere completamente il diaframma di campo e aprire il diaframma di apertura; nel campo ottico sarà visibile il campo luminoso nella minima estensione consentita;
- alzare al massimo il condensatore ed, agendo sulle apposite manopole, regolarne la posizione in modo da centrare il campo luminoso del diaframma al centro del campo ottico;
- quindi regolare in altezza il condensatore finché i bordi dell'immagine del diaframma di campo non diventano nitidi;
- riaprire parzialmente il diaframma di campo in modo da ottenere un campo luminoso di diametro leggermente inferiore al campo ottico;
- regolare, infine, il diaframma di apertura prima chiudendolo lentamente fino a percepire nell'immagine una variazione di contrasto, quindi riaprendolo leggermente.

Prima e dopo l'esecuzione dell'osservazione microscopica, procedere alla disinfezione degli oculari con un agente disinfettante al 3% (2.1.4.1.) in acqua per evitare la trasmissione di eventuali infezioni oculari da un operatore all'altro.

2.1.5.4. Esame microscopico e conteggio degli organismi

L'osservazione del campione in giornata è sempre da preferire. È considerata comunque accettabile anche l'osservazione effettuata nel giorno successivo. Qualora l'esame del campione in camera di sedimentazione venga effettuato nei giorni immediatamente successivi, è consigliabile mantenere la camera in condizioni refrigerate a (5 ± 3) °C. In tal caso, tuttavia, la stima degli organismi dovrà considerare la possibilità che la percentuale di organismi immobili sia aumentata rispetto ad una valutazione effettuata invece entro le 24 ore.

La camera di sedimentazione, contenente il campione sedimentato, potrà essere tenuta vicino al microscopio per ridurre al minimo il rischio di agitazione del campione al momento del posizionamento sul tavolino del microscopio per l'osservazione.

Posizionare la camera con il volume di campione sedimentato sulla base del microscopio invertito. Osservare quindi tutta l'area di base della camera utilizzando l'obiettivo 4x. Questa procedura consente di effettuare in tempi relativamente brevi l'osservazione e il conteggio dei Nematodi depositati sulla base ed eventualmente presenti nel campione.

Non è necessario effettuare nessun calcolo in quanto il conteggio viene effettuato direttamente su tutto il volume messo a sedimentare.

In fase di conteggio è possibile enumerare in modo distinto gli individui vivi e quelli morti, che potranno essere registrati separatamente sul referto analitico. Per distinguerli si fa riferimento, generalmente, alla motilità degli organismi: l'assenza di movimenti, osservabile per circa 30 secondi, può rappresentare un segnale di mancanza di vitalità dell'organismo.

Durante l'esecuzione di questa analisi, oltre ai Nematodi, è possibile effettuare l'osservazione e il conteggio anche di altri Metazoi e di Protozoi nonché la valutazione complessiva della qualità del campione di acqua in quanto ad elementi figurati. È possibile anche effettuare la conta e la speciazione degli elementi algali facendo comunque riferimento al metodo specifico.

2.1.5.5. Misurazione con il micrometro oculare del materiale osservato

Nel caso fosse necessario misurare le dimensioni dei microrganismi si può ricorrere all'uso del micrometro oculare. La misura in μm dell'oggetto osservato si ottiene moltiplicando il numero delle incisioni misurate col micrometro oculare per i coefficienti micrometrici (ottenuti dal rapporto fra il micrometro oculare e il micrometro oggetto).

2.1.5.6. Pulizia della camera

Per ogni nuovo campione da analizzare, verificare che il fondo della camera di sedimentazione sia perfettamente pulito. Controllare al microscopio invertito la camera, prima con l'obiettivo 4x, poi, se necessario, con gli obiettivi a maggiore ingrandimento. Nel caso che la camera sia stata asciugata con carta assorbente saranno visibili, sul fondo, alcuni filamenti dall'aspetto caratteristico che comunque non interferiranno con la lettura del campione.

La corretta pulizia della camera si esegue riempiendo completamente la camera di sedimentazione con una soluzione acquosa di disinfettante (2.1.4.1.). Lasciare a contatto per qualche ora; quindi lavare accuratamente tutte le superfici della camera, e particolarmente il fondo e tutte le superfici interne che sono state a contatto con il campione, con detergente cremoso non abrasivo (2.1.4.2.), spugnetta non abrasiva (2.1.4.3.) e acqua di rubinetto. Sciacquare accuratamente con acqua di rubinetto, quindi con acqua distillata e mettere ad asciugare in stufa a $(55 \div 60)^\circ\text{C}$ per alcune ore.

In alternativa, è possibile, dopo il risciacquo con acqua distillata, asciugare la camera con carta assorbente e metterla in stufa a $(55 \div 60)^\circ\text{C}$ quanto basta per completare l'asciugatura. Si tenga presente che eventuali microrganismi particolarmente affini alla superficie interna della camera di sedimentazione, come ad esempio le microamebe, non vengono rimossi con quest'ultimo metodo. Di ciò dovrà essere tenuto conto nella lettura del campione successivo.

2.1.5.7. Identificazione tassonomica

Nel caso si voglia procedere alla identificazione tassonomica degli organismi rilevati è consigliabile inviare il campione ad un centro specializzato per il riconoscimento delle specie. In tal caso, prima dell'invio, un campione concentrato va fissato, impiegando le dovute attenzioni, con acido acetico o propionico e formaldeide.

2.1.6. Interferenze

Possono essere causa di interferenza nella lettura dei risultati la presenza di cristalli e altri materiali, artefatti dovuti alla fissazione od alla raccolta del campione in bottiglie contenenti tiosolfato di sodio; presenza di graffi e di bolle di aria sul fondo della camera di sedimentazione spesso dovuti ad errata pulizia della camera.

2.1.7. Espressione dei risultati

Riportare il risultato come numero di individui/L.

2.2. Metodo - ISS A 010B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Nonostante la normativa richieda soltanto una verifica della presenza di Nematodi nelle acque destinate al consumo umano, con il seguente metodo viene data la possibilità di effettuare, se presenti, la loro analisi quantitativa.

La procedura analitica si basa sulla concentrazione del campione mediante filtrazione su membrana e successivo conteggio degli organismi mediante osservazione al microscopio.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice) è necessario avere a disposizione:

- dispositivo di filtrazione in linea;
- membrane di esteri di cellulosa con porosità nominale di 3 µm;
- microscopio ottico invertito con obiettivi 10x, 20x, 40x;
- camere di sedimentazione;
- recipienti di plastica da 10 L.

2.2.3 Volume da analizzare

Il volume di campione da prelevare per questa determinazione è di 1-3 L per acque superficiali da inviare alla potabilizzazione e di almeno 10 L per acque destinate al consumo umano, utilizzando taniche di plastica o bottiglie di vetro. I contenitori devono essere puliti, ma non necessariamente sterili; è sufficiente che siano lavati con acqua corrente e sciacquati con acqua distillata.

Per acque destinate al consumo umano da tenere sotto controllo in maniera routinaria, dopo la fase iniziale di studio che serve per individuare la concentrazione dei Nematodi, si possono ridurre progressivamente i volumi, fino ad arrivare a misure standard, sulla base del numero degli organismi riscontrati.

2.2.4. Reagenti

2.2.4.1. Acido acetico o propionico

Usare, con le dovute precauzioni, sotto cappa chimica.

2.2.4.2. Formaldeide

Usare, con le dovute precauzioni, sotto cappa chimica.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Campionamento

Trasportare il campione in laboratorio e procedere all'analisi che dovrà essere svolta nel più breve tempo possibile e terminata entro 2 giorni dal prelievo. Se non fosse possibile rispettare questi tempi di analisi, procedere al più presto quantomeno a concentrare il campione e fissarlo con i liquidi conservanti (2.2.4.1. e 2.2.4.2.).

2.2.5.2. Concentrazione

Filtrare il campione, a bassa pressione, attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità nominale di 3 µm. Prima della filtrazione agitare il campione in maniera ondulatoria per evitare che organismi possano rimanere sul fondo del recipiente e, dopo la filtrazione, lavare le pareti dell'apparato di filtrazione, con acqua distillata, per raccogliere ogni eventuale residuo.

Fare aderire la membrana alla parete della camera di sedimentazione e, con l'acqua filtrata o sottratta al volume iniziale prima della filtrazione, lavarla ripetutamente, mediante spruzzetta o

pipetta capillare, per rimuovere i Nematodi eventualmente presenti e risospenderli nel campione. Nella necessità di analizzare un volume di acqua particolarmente elevato, per evitare difficoltà di lettura dovute all'eventuale presenza di particolato, il campione può essere filtrato in più frazioni. Lasciare sedimentare il preparato per almeno 15 ore prima di procedere all'osservazione microscopica e, nel caso non si possa effettuare il conteggio entro le 24 ore dalla sedimentazione, fissare il campione con i liquidi conservanti. In tal caso, aggiungere al campione concentrato, nella camera di sedimentazione, acido acetico o propionico e formaldeide (2.2.4.1. e 2.2.4.2.) in modo che i Nematodi vengano a trovarsi in una soluzione di acido al 5-15% e di formaldeide al 2-5%; l'acido acetico fa morire i vermi distesi e li rende più trasparenti, la formaldeide rende i loro tessuti un pò granulosi e opachi correggendo l'effetto dell'acido. Il campione fissato si mantiene per un tempo indefinito a (5 ± 3) °C.

In alternativa e/o in casi particolari, possono essere utilizzati dispositivi di filtrazione in linea che permettono di concentrare il campione direttamente in loco, al momento del prelievo. Tali dispositivi (ad esempio, ne esistono in commercio in policarbonato) sono particolarmente utili per esaminare volumi piuttosto elevati di acqua ed evitare problemi connessi al trasporto di grossi quantitativi.

In tal caso, adottare la seguente procedura.

Inserire la membrana filtrante fra le due parti del dispositivo che viene montato al rubinetto del prelievo tramite un tubo di gomma, seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Dalla parte opposta inserire un secondo tubo di gomma per fare defluire l'acqua in una tanica di capacità nota, onde potere quantificare il volume filtrato (in alternativa utilizzare un contalitri). Aprire il rubinetto in modo che l'acqua scorra a una pressione non troppo elevata e aspettare il tempo necessario a concentrare il volume prefissato. Dopo il prelievo, smontare il dispositivo e metterlo in una busta di plastica pulita; trasportarlo in laboratorio in condizioni refrigerate. In laboratorio è preferibile smontare immediatamente la membrana filtrante e procedere subito alla preparazione del campione per la osservazione microscopica.

2.2.4.3. Osservazione microscopica

Procedere all'osservazione, mediante microscopio invertito, a 100 ingrandimenti, operando su tutto il fondo della camera di sedimentazione e su ogni frazione filtrata; contare i Nematodi presenti. I valori ottenuti sono riferiti al volume di acqua filtrato. Per un'indagine più approfondita distinguere i Nematodi in vivi e morti ed esaminarli ad ingrandimento maggiore.

2.2.4.4. Identificazione tassonomica

Nel caso si voglia procedere all'identificazione tassonomica è consigliabile inviare il campione a un centro specializzato per il riconoscimento delle specie. In tal caso, prima dell'invio, un campione concentrato va fissato, impiegando le dovute attenzioni, con acido acetico o propionico e formaldeide.

2.2.6. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come numero di individui/L.

Bibliografia

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th, ed. Washington, DC: APHA; 2005.
2. Burrini D, Lupi E. Nematodi in acqua superficiale e trattamenti di potabilizzazione. In: Zavatti A (Ed.). *Quaderni e tecniche di protezione ambientale, Acque potabili – Argomenti e tecniche di Microbiologia Ambientale*. Bologna: Pitagora Editrice; 1999.

3. Lupi E, Ricci V and Burrini D. Occurrence of Nematodes in surface water used in a drinking water plant. *Aqua* 1994;43:107-12.
4. Lupi E, Ricci V and Burrini D. Recovery of bacteria in Nematodes isolated from a drinking water supply. *Aqua* 1995;44:212-18.
5. UNI 11005. *Acqua destinata al consumo umano. Ricerca e determinazione degli elminti*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.
6. UNICHIM 964. *Ricerca e determinazione degli Elminti - Manuale 168. Acque Destinate al Consumo Umano – Metodi microbiologici, parte II*. Milano: Associazione per l'Unificazione nel Settore dell'Industria Chimica; 1995.
7. Utermohl H. Zur VervollKommung der quantitative Phytoplankton Methodik. *Mitt Int Verein Limnol* 1958;9:38.
8. Zullini G. *Guida per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne Italiane: Nematodi*. Roma: Istituto di Ricerca Sulle Acque – CNR; 1982. (AQ/1/190).

DETERMINAZIONE DEGLI ENTEROBATTERI PATOGENI: *SALMONELLA*

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Salmonella* rilevato con i metodi ISS A [011A rev. 00; 011B rev. 00; 011C rev. 00].

Il genere *Salmonella* comprende microrganismi bastoncellari appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, gram negativi, aerobi e anaerobi facoltativi, C8-esterasi positivi, non fermentanti 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 e 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 asintomatici. 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*, *S. schottmuelleri* e *S. hirschfeldii*). 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 e 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 °C.

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 DL.vo n. 31 del 2001 e s.m.i. Quale patogeno umano, *Salmonella* deve essere obbligatoriamente assente nelle acque destinate al consumo umano.

1. Campo di applicazione

Le procedure di analisi ISS A [011A rev. 00; 011B rev. 00; 011C rev. 00] vengono utilizzate per il rilevamento di *Salmonella* spp. nelle acque da destinare e destinate al consumo umano ed eventualmente nelle acque di piscina.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo - ISS A 011A rev. 00

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).

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. 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, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Dopo aver sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (121 ± 3) °C. Conservare a (5 ± 3) °C 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	13,58	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 si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo) e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (115 ± 3) °C. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

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

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

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±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva 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.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e come controllo negativo *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.4.4. Reattivo al 4-metil umbelliferil caprilato

Composizione		
4-metil umbelliferil caprilato	1	%
Eptano	99	%

Prodotto brevettato, disponibile in commercio, da usare e conservare secondo le istruzioni della ditta produttrice. Il prodotto è classificato come infiammabile (F) e irritante (Xi) per la presenza di eptano. Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

2.1.4.5. 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, controlla e conserva seguendo 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 minuti. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.1.4.6. Soluzione di tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione	
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. È da segnalare che tale prodotto viene classificato, ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

2.1.4.7. 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, controlla e conserva seguendo 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) °C per 15 minuti, 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 è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.4.8. 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, controlla e conserva seguendo 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) °C per 15 minuti, 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 è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e come controllo negativo *Shigella flexneri* ATCC 12022; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.5. Procedura**2.1.5.1. Fase di prearricchimento**

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in un idoneo brodo di coltura non selettivo. Sebbene sia consigliabile per la tipologia specifica delle acque da analizzare, la fase di prearricchimento può essere omessa sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti modifiche dei risultati ottenuti. La procedura di seguito riportata tuttavia propone lo svolgimento di tutte le fasi.

Filtrare non meno di 1 L di campione attraverso una membrana di esteri di cellulosa 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 0,7/0,2 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) °C per $(16 \div 20)$ 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 brodocoltura in brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis (2.1.4.2.). Incubare a (42 ± 1) °C per $(18 \div 24)$ 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.

2.1.5.3. Fase di isolamento e 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 18 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 24 ore d'incubazione.

Incubare a (36 ± 1) °C per $(20 \div 24)$ 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, con odore tipico; di solito è presente un centro nero caratteristico con viraggio del terreno al blu. *Shigella* cresce come colonie verde chiaro senza viraggio del terreno. I coliformi crescono come colonie color salmone e 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 e 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, risolvibile con la prova della C8-esterasi.

2.1.5.4. Prova della C8-esterasi

Per l'accertamento presuntivo dell'appartenenza al genere *Salmonella*, versare sulle colonie sospette una goccia del reattivo al 4-metil umbelliferil caprilato (2.1.4.4.), seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

La reazione è positiva quando si manifesta, entro (3÷5) minuti, una fluorescenza blu. Le salmonelle sono C8-esterasi positive. *Proteus* e *Shigella* sono C8-esterasi negativi.

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%.

2.1.5.5. 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 (2.1.4.5.) incubando a (36 ± 1) °C per (18÷24) ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.1.5.6. Prova della citocromossidasi

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Triptone Soia Agar (2.1.4.5.). Strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.1.4.6.) 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.

2.1.5.7. Prova della fermentazione dei carboidrati

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno Triptone Soia Agar (2.1.4.5.), la colonia sospetta e, per infissione e successivo strisciamento, trasferire sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro di Kligler (2.1.4.7.). Incubare a (36 ± 1) °C 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 Kliger Iron Agar

Microrganismo	Tipo di reazione		
	Superficie inclinata	Fondo	H2S
<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</i> spp.	Alcalina	Acida /con gas	+
<i>Salmonella arizonae</i>	Alcalina	Acida /con gas	+
<i>Proteus morganii</i>	nessuna	Acida	-
<i>Proteus vulgaris</i>	nessuna	Acida	+
<i>Shigella</i>	nessuna	Acida	-

2.1.5.8. Prova della decarbossilazione della lisina

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno Triptone Soia Agar (2.1.4.5.), la colonia sospetta e, per infissione e successivo strisciamento, trasferire sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro e lisina (2.1.4.8.). Incubare a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 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 stipiti che producono idrogeno solforato determinano un annerimento del terreno per la precipitazione di solfuro di ferro.

2.1.5.9. 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 *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 stipiti ai centri di riferimento per la *Salmonella*. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi 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 - ISS A 011B rev. 00**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).

2.2.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 1 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, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Dopo aver sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Conservare a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ 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, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo) e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a $(115 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Conservare a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ 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°C . Il substrato contiene magnesio cloruro, classificato come irritante (Xi). Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

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, controlla e conserva 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 in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Raffreddare alla temperatura di (50 ± 5) °C. 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.

2.2.4.4. Supplemento A

Composizione	
Agenti emulsionanti	11,4 mL

Aggiungere, ad 1 L di terreno di base (2.2.4.3.), 11,4 mL di supplemento. Mescolare accuratamente e portare ad ebollizione sotto agitazione. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti.

2.2.4.5. Supplemento B

Composizione	
Cefsulodina	5 mg
Acqua distillata sterile	4 mL

Sciogliere il supplemento in 4 mL di acqua distillata sterile.

Aggiungere, in condizioni di asepsi, il supplemento ad 1 L di terreno di base (2.2.4.3.) addizionato del supplemento A e sterilizzato.

2.2.4.6. Terreno completo Chromogenic Salmonella Agar

Composizione	
Terreno di base (2.2.4.3.)	1000 mL
Supplemento A (2.2.4.4.)	11,4 mL
Sol. di supplemento B (2.2.4.5.)	4 mL
pH 7,2±0,2	

Dopo avere aggiunto i supplementi al terreno di base, distribuire in capsule di Petri. Lasciare solidificare. Conservare a (5 ± 3) °C 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 e ambientali. Il sistema selettivo-differenziale del terreno permette di isolare anche i rari ceppi di *Salmonella* fermentanti il lattosio.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e come controllo negativo *Ps. aeruginosa* ATCC 27853; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.2.4.7. 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, controlla e conserva seguendo 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 minuti. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.2.4.8. Soluzione di tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione	
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. 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. Sebbene sia consigliabile per la tipologia specifica delle acque da analizzare, la fase di prearricchimento può essere omessa sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti modifiche dei risultati ottenuti. La procedura di seguito riportata tuttavia propone lo svolgimento di tutte le fasi.

Filtrare non meno di 1 L di campione attraverso una membrana di esteri di cellulosa 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 0,7/0,2 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 (2.2.4.1.). Incubare a (36 ± 1) °C per $(16 \div 20)$ 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 brodocoltura in brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis (2.2.4.2.). Incubare a (42 ± 1) °C per $(18 \div 24)$ 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.

2.2.5.3. Fase di isolamento e identificazione delle colonie

Prelevando un'ansata dal brodo di arricchimento (2.2.4.2.), eseguire 2 subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento Chromogenic Salmonella Agar (2.2.4.5.): la prima dopo 18 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 24 ore.

Incubare a (36 ± 1) °C per $(20 \div 24)$ ore. Le colonie sospette di *Salmonella*, *Salmonella lac+* e *Salmonella typhi* si presentano di colore rosso-magenta (colonie C8-esterasi positive). 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 (colonie C8-esterasi positive). *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 (2.2.4.7.) incubando a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per (18÷24) ore. Eseguire la prova su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

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 (2.2.4.7.). Strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.2.4.8.) 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 stipiti 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 stipiti 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 - ISS A 011C rev. 00**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).

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. 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, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Dopo aver sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Conservare a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ 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, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo) e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a $(115 \pm 3) ^\circ\text{C}$. Conservare a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ 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°C . Il substrato contiene magnesio cloruro, classificato come irritante (Xi). Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

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, controlla e conserva seguendo 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 $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali. Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare colture di riferimento certificate.

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, controlla e conserva seguendo 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 minuti. 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.

2.3.4.5. *Soluzione di tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%*

Composizione	
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. 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. Sebbene sia consigliabile per la tipologia specifica delle acque da analizzare, la fase di prearricchimento può essere omessa sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti modifiche dei risultati ottenuti. La procedura di seguito riportata tuttavia propone lo svolgimento di tutte le fasi.

Filtrare non meno di 1 L di campione attraverso una membrana di esteri di cellulosa 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 $0,7/0,2 \mu\text{m}$) 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 (2.3.4.1.). Incubare a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per (16÷20) 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 brodocoltura in brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis (2.3.4.2.). Incubare a (42 ± 1) °C per (18÷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.

2.3.5.3. Fase di isolamento e 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 18 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 24 ore.

Incubare a (36 ± 1) °C per (24÷48) ore. Il genere *Salmonella*, escluse *S. typhi* e *S. paratyphi* A, forma colonie rosso intenso, con viraggio di colore del terreno al rosa intenso (a 24 ore sono abitualmente presenti un anello incolore alla periferia delle colonie e un anello di terreno non virato al rosa intorno alle colonie medesime; entrambi gli anelli scompaiono nelle 24 ore successive); *S. typhi* e *S. paratyphi* A crescono come colonie incolore/giallo; *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* si presentano con colonie verdi-blu. *Proteus mirabilis* e *Shigella flexneri* formano colonie beige, *Pseudomonas* colonie color salmone, 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 ± 1) °C per (18÷24) 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'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.

2.3.5.6. 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 *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 stipiti ai centri di riferimento per la *Salmonella*. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

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

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th ed ., Washington, DC: APHA; 2005.
2. APAT/IRSA-CNR. *Metodi Analitici per le Acque. 29/2003*. Roma: APAT/IRSA-CNR; 2003.
3. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Michel Y. Popoff and Léon *Le Minor Formules Antigeniques des Serovars de Salmonella*. Geneve; WHO; 2001.

DETERMINAZIONE DEGLI ENTEROBATTERI PATOGENI: *SHIGELLA*

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Shigella* rilevato con i metodi ISS A [012A rev. 00; 012B rev. 00; 012C rev. 00].

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 e 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) e 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 DL.vo n. 31 del 2001 e s.m.i. Quale patogeno umano, *Shigella* deve essere obbligatoriamente assente nelle acque destinate al consumo umano.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS A [012A rev. 00; 012B rev. 00; 012C rev. 00] vengono utilizzate per il rilevamento di *Shigella* nelle acque da destinare e destinate al consumo umano ed eventualmente nelle acque di piscina.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo - ISS A 012A rev. 00

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).

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 $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 min. Conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ 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 ± 3) °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 è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Shigella flexneri* ATCC 12022 e come controllo negativo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

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±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.

2.1.4.4. 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±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; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

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 ± 3) °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 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 (2.1.4.1.) e incubare a (36 ± 1) °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 ± 1) °C per (20 ÷ 24) ore.

Su Xilosio Lisina Desossicolato le colonie sospette di *Shigella* si presentano rosse, C8-esterasi negative. Anche *Proteus inconstans*, *Proteus rettgeri* e *Proteus morgani* formano colonie rosse, C8-esterasi negative. *Salmonella paratyphi A* e *Salmonella cholerae-suis* formano colonie rosse, ma C8-esterasi positive. *Salmonella arizonae* e *Salmonella spp.* formano colonie rosse con centro nero, C8-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 $(18 \div 24)$ 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 ± 20 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 Kligler (2.1.4.4.). Incubare a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per $(18 \div 24)$ ore. È essenziale che i risultati siano registrati dopo $(18 \div 24)$ 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 - ISS A 012B rev. 00

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).

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		
Triptosio	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; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

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 ± 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; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

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 ± 3) °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 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 (2.2.4.1.) e incubare a (36 ± 1) °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 ± 1) °C per (20 ÷ 24) ore.

Su *Salmonella Shigella* Agar le colonie sospette si presentano incolore, 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 ± 1) °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 ± 20 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 Kliger (2.2.4.4.). Incubare a (36 ± 1) °C per $(18 \div 24)$ ore. È essenziale che i risultati siano registrati dopo $(18 \div 24)$ 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 stipti ai centri di riferimento. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi 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 - ISS A 012C rev. 00

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).

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; in alternativa, comunque, utilizzare culture di riferimento certificate.

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; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

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 $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 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 $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 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 e 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 $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 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 $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 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.

2.3.5.7. 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 stipti 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

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th ed. Washington, DC: APHA; 2005.
2. Manafi M, Sommer R. Comparison of three rapid screening methods for *Salmonella* spp.: MUCAP Test, MicroScreen Latex and Rambach Agar. *Lett Appl Microbiol* 1992;14:163-9.

DETERMINAZIONE DEGLI ENTEROBATTERI PATOGENI: *VIBRIO*

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Vibrio* rilevato con il metodo ISS A 013A rev. 00.

Microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* sono stati descritti per la prima volta da Pacini nel 1854. Trentadue anni più tardi lo stesso tipo di batteri fu isolato da Koch che li classificò con il nome di *Kommabacillus*.

I vibriani, batteri gram-negativi, ossidasi-positivi, asporigeni, motili, aerobi e anaerobi facoltativi, possono manifestare uno spiccato polimorfismo, ma sono generalmente bastoncelli di 2-3 µm di lunghezza e 0,6 µm di larghezza. All'osservazione al microscopio il vibrione del colera presenta una tipica forma a virgola (*Kommabacillus* o bacillo a virgola di Koch); a volte due o più cellule si possono osservare unite con le curve disposte in senso opposto, così da assumere una conformazione a S, oppure possono essere riunite in catena con aspetto ad elica.

I microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* sono ampiamente distribuiti nell'ambiente acquatico dove la loro presenza è comunque difficilmente correlabile a quella degli indicatori di contaminazione fecale. Infatti, a differenza della maggior parte dei patogeni enterici, che vengono immessi nell'ambiente idrico attraverso gli scarichi, vibriani sono isolati, oltre che da acque reflue e acque estuariali, anche da acque dolci superficiali non contaminate da scarichi fecali. Aumenti della loro rilevabilità nell'ambiente sono legati a variazioni delle condizioni climatiche (il recente fenomeno El Niño è stato utilizzato a parziale interpretazione dell'ultima pandemia di colera verificatasi in America centro-meridionale) e le epidemie di colera in Asia sono state spesso associate alle inondazioni stagionali.

I vibriani, che maggiormente interessano la patologia umana sono rappresentati essenzialmente dalla specie *Vibrio cholerae*, agente eziologico del colera, malattia caratterizzata nell'uomo da una gastroenterite acuta. Altri microrganismi appartenenti al genere, quali *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, fanno parte del gruppo dei vibriani alofili e sono spesso associati a manifestazioni diarroiche, ad infezioni cutanee, otiti e forme setticemiche, prevalentemente in soggetti immunodepressi.

Acqua e alimenti (prevalentemente crostacei e molluschi) sono generalmente implicati nella trasmissione delle infezioni e del colera in particolare. Della specie *V. cholerae* sono stati individuati più di 130 sierogruppi e prima del 1992 solo il sierogruppo O1 era stato associato ad epidemie e a casi di colera. Dal 1993 anche biotipi O139/non-O1, rilevabili frequentemente nell'ambiente acquatico, sono stati segnalati come responsabili di patologie simil-coleriche, di manifestazioni cliniche riconducibili ad infezioni localizzate nei tessuti molli e nelle mucose e ad infezioni sistemiche.

Vibrio cholerae non è emolitico, tranne gli stipiti El Tor che producono una emolisina solubile. Non resiste né al calore - viene, infatti, ucciso in 15 ÷ 20 minuti a 55°C - né agli altri agenti fisici e ai comuni disinfettanti. È molto sensibile agli acidi dai quali viene distrutto rapidamente, ma resistente a condizioni alcaline. Il biotipo El Tor presenta una maggiore resistenza agli agenti fisici e chimici ed è in grado di permanere più a lungo a livello dell'intestino dei soggetti infettati, che divengono veri e propri portatori sani.

In condizioni sperimentali la resistenza dei vibriani in ambiente idrico oscilla da 1 giorno ad 1 anno; hanno, infatti, una elevata adattabilità alle variazioni climatiche e, grazie a modificazioni genotipiche e fenotipiche, riescono a sopravvivere a lungo nell'ambiente. In condizioni ambientali ostili tendono ad assumere dimensioni ridotte, ovvero, pur restando metabolicamente attivi, possono perdere la capacità di moltiplicarsi tendendo quindi a rimanere vitali ma diventando non coltivabili (VBNC).

La presenza di microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* nelle acque potabili è rara; è comunque generalmente segnalata in zone dove la malattia è endemica. 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 pari a 30 minuti.

Vibrio deve essere ricercato 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 DL.vo n. 31 del 2001 e s.m.i. Quale patogeno umano, *Vibrio* deve essere obbligatoriamente assente nelle acque destinate al consumo umano.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica ISS A 013A rev. 00 viene utilizzata per la determinazione di *Vibrio* spp. nelle acque da destinare e destinate al consumo umano ed eventualmente nelle acque di piscina.

2. Principio del metodo

Il metodo consente di valutare la Presenza/Assenza di *Vibrio* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in fasi successive che comprendono Arricchimento, Isolamento e Conferma biochimica e, eventualmente, Conferma sierologica.

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice).

4. Terreni di coltura e reagenti

4.1. Brodo di arricchimento

4.1.1. Acqua Peptonata Alcalina

Composizione	
Idrosilato triptico di caseina	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, evitando il surriscaldamento. Raffreddare e, se necessario, modificare il pH con l'aggiunta di NaOH 0,1 N (4.1.2.). Distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per 15 min. Conservare a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per non più di quattro settimane in condizioni ottimali.

4.1.2. Soluzione di idrossido di sodio NaOH 0,1 N

Composizione	
Idrossido di sodio	4 g
Acqua distillata	1000 mL

Sciogliere l'idrossido di sodio in acqua distillata. 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
Sodio tiosolfato	10 g
Peptone	10 g
Sodio citrato	10 g
Bile di bue	8 g
Saccarosio	20 g
Sodio cloruro	10 g
Citrato ferrico	1 g
Blu di bromotimolo	40 mg
Blu timolo	40 mg
Agar	15 g
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, evitando il surriscaldamento. Se necessario, modificare il pH con l'aggiunta di un'aliquota di NaOH 0,1 N (4.1.2.). Non sterilizzare. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare.

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

È stato osservato che la selettività dei diversi terreni al Tiosolfato Citrato Bile e Saccarosio presenti sul mercato può essere diversa: ciò può portare a risultati diversi nella crescita del microrganismo ricercato.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *V. fluvialis* NCTC 11212 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

4.2.2. Triptone Soia Agar con NaCl all'1%

Composizione	
Triptone	15 g
Peptone di soia	5 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,3±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 per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Aggiungere 1 mL di una soluzione di NaCl all'1% per ogni 100 mL di terreno. Sterilizzare 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.

4.2.3. Brodo al Triptone di Soia con NaCl all'1%

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	17 g
Digerito papainico di farina di soia	3 g
Sodio cloruro	5 g
Potassio fosfato monoacido	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 seguendo 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 all'1% per ogni 100 mL di terreno. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo. Sterilizzare a (121 ± 3) °C per 15 min. Conservare a (5 ± 3) °C per non più di un mese.

4.3. Reagenti

4.3.1. Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione	
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. È da segnalare che tale prodotto viene classificato, ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

4.3.2. Vibriostatico

Utilizzare i dischetti da 10 µg e da 150 µg di vibriostatico O/129 (2,4-diamino-6,7-di-isopropil-pteridina fosfato) disponibili in commercio.

4.3.3. Soluzione al desossicolato

Composizione	
Sodio desossicolato	0,5 g
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere il sodio desossicolato in acqua distillata. Preparare la soluzione al momento dell'uso. Il reattivo serve per lo svolgimento dello String test.

5. Procedura

5.1. 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.

5.2. Fase di Arricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo. Filtrare non meno di 1 L di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro con porosità nominale di 0,45 µm (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici da 0,7/0,2 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 Alcalina (4.1.1.). Incubare a (36 ± 1) °C per $(6 \div 8)$ ore, fino a un massimo di 18 ore. Per i campioni ambientali sono anche stati ottenuti buoni risultati con incubazione a 42°.

5.3. Fase di Isolamento e identificazione delle colonie

Dal brodo di arricchimento (4.1.1.) prelevare un'ansata della pellicola formata sulla superficie del brodo ed effettuare uno striscio sul terreno di isolamento (4.2.1.). Incubare a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per $(18 \div 24)$ 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 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per $(6 \div 8)$ ore, fino a un massimo di 18 ore. Dopo incubazione prelevare un'ansata dalla pellicola formata sulla superficie del brodo ed effettuare uno striscio sul terreno di isolamento (4.2.1.). Incubare a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per $(18 \div 24)$ ore.

Il terreno al Tiosolfato Citrato Bile e Saccarosio agar, per il suo pH alcalino e per il contenuto in sali, inibisce la crescita della maggior parte dei microrganismi, fatta eccezione per gli alofili. Gli enterobatteri ossidasi-negativi non crescono; le rare colonie di alcuni ceppi di *Proteus* e di enterococchi sono facilmente distinguibili per le ridotte dimensioni e per essere prive di colorazione.

I microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* sviluppano sul substrato di isolamento (4.2.1.) colonie gialle piatte con centro opaco e margini traslucidi, e colonie blu-verdi, piatte. *Vibrio cholerae* dopo $(18 \div 24)$ ore d'incubazione, cresce formando colonie gialle (fermentazione del saccarosio) con diametro di 2-3 mm. *V. parahaemolyticus* non fermenta il saccarosio e sviluppa colonie blu-verdi con diametro di 3-5 mm. *V. alginolyticus* fermenta il saccarosio e produce colonie gialle con diametro 3-5 mm.

L'esame e il conteggio delle colonie devono essere effettuati subito dopo il periodo di incubazione nell'incubatore; se lasciate a temperatura ambiente le colonie gialle virano al verde.

6. Conferma

6.1. Prove biochimiche

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie sospette al genere *Vibrio* è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma: colorazione di gram, prova della presenza della citocromossidasi, prova della suscettibilità al vibriostatico, String test.

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 con NaCl all'1% (4.2.2.) incubando a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (21 ± 3) ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

6.2. Colorazione di Gram

Eseguire sulle colonie da verificare la colorazione di Gram. I microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* si presentano come bastoncini Gram negativi, in alcuni casi ricurvi.

6.3. 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.

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Triptone Soia Agar con NaCl all'1% (4.2.2.). Strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (4.3.1.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio. Una reazione positiva si evidenzia quando si produce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.

6.4. Prova della suscettibilità al vibriostatico

La prova può permettere di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* - in genere suscettibile al vibriostatico - da quelli appartenenti al genere *Aeromonas*, resistente.

Dal terreno Triptone Soia Agar con NaCl all'1% (4.2.2.) 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% (4.2.3.). Incubare a (36 ± 1) °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% (4.2.2.). Sulla superficie dell'Agar applicare, ad adeguata distanza, un dischetto da 10 µg e uno da 150 µg di vibriostatico O/129 (4.3.2.). Incubare a (36 ± 1) °C per (18÷24) ore.

Dopo incubazione verificare l'eventuale presenza o assenza di aloni di inibizione intorno ai dischetti. La presenza di aloni di inibizione segnala la suscettibilità al vibriostatico. Sono riportati casi in cui biotipi di *V. cholerae* sono risultati resistenti al vibriostatico (*V. cholerae* O139).

6.5. String test

La prova può permettere di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* da quelli appartenenti al genere *Aeromonas*.

Stemperare un'ansata della colonia da saggiare in poche gocce di desossicolato (4.3.3.) poste su vetrino portaoggetti. Una reazione positiva per *Vibrio cholerae* si evidenzia quando si produce, dopo circa 60 s, una miscela mucosa e vischiosa. Altri vibrioni possono dare una iniziale reazione positiva che può diminuire o scomparire dopo 45-60 secondi. Il test risulta negativo per *Aeromonas* spp.

6.6. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche culturali 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 dei vibrioni. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

7. Espressione dei risultati

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

Bibliografia

1. Kay BA, Bopp CA, Wells JG. Isolation and identification of *Vibrio cholerae* O1 from fecal specimens. In: Wachsmuth IK, Blake PA and Olsvik O (Ed.). *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1994.
2. Kaysner, CA, Hill WE. Toxigen *Vibrio cholerae* O1 in food and water. In: Wachsmuth IK, Blake PA and Olsvik O (Ed.). *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*. Washington, DC: American Society for Microbiology; 1994. p. 210-60.

DETERMINAZIONE DI BATTERI OPPORTUNISTI PATOGENI: *AEROMONAS* SPP.

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Aeromonas* rilevato con il metodo ISS A 014A rev. 00.

I microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas*, famiglia *Aeromonadaceae*, sono bastoncelli motili e non motili, non sporigeni, gram-negativi, ossidasi positivi, facoltativi anaerobi. Hanno molte caratteristiche biochimiche in comune con quelli della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, differenziandosi primariamente per la positività alla citocromossidasi; alcune specie sono glucuronidasi positive. La tassonomia del genere è in continua evoluzione per quanto riguarda il rilievo delle caratteristiche fenotipiche e delle proprietà genetiche. Finora è stata accertata l'esistenza di 18 gruppi di ibridizzazione non tutti distinguibili su base biochimica. La classificazione tradizionale riporta la distinzione tra *Aeromonas salmonicida*, specie psicrofila non motile e patogeno dei pesci, e *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii* e *A. schubertii*, specie mesofile.

Alcuni genotipi sono considerati potenziali responsabili di patologie (infezioni sistemiche, gastroenteriche e cutanee) per l'uomo e negli anni '80 l'Organizzazione Mondiale della Sanità aveva inserito *Aeromonas* nell'elenco degli agenti enteropatogeni emergenti. I dati più recenti, tuttavia, non confermano né smentiscono le potenzialità degli *Aeromonas* come enteropatogeni. Infatti, dosi infettanti variabili tra 10^7 e 10^{10} hanno dato luogo, in maniera incongrua, a gastroenteriti nell'uomo e le stesse frequenze di isolamento di *Aeromonas* spp. sono state osservate in adulti sintomatici e asintomatici. Inoltre, negli anni più recenti, è stato messo in evidenza, tramite l'uso di tecniche molecolari, che spesso i genotipi che si ritrovano nell'ambiente, non hanno le stesse caratteristiche di quelli patogeni.

Sebbene la patogenesi delle infezioni da *Aeromonas* rimanga tuttora incerta, le specie mesofile possiedono numerosi fattori di virulenza che comprendono meccanismi di adesione e produzione di numerose tossine. L'espressione di fattori di virulenza, in alcuni casi, sembra influenzata dalle condizioni ambientali e stagionali.

Il microrganismo è ubiquitario e autoctono in tutti gli ambienti acquatici. La sua presenza viene associata allo sviluppo di fenomeni di produzione di biofilm dove viene rilevato con una relativa frequenza. Nelle acque in rete, l'aumento delle sue densità generalmente è messo in relazione ad una diminuzione della concentrazione di cloro residuo libero, sebbene le sue più alte densità in acque clorate siano rilevate soprattutto nel periodo estivo. *Aeromonas hydrophila* viene rilevato in acque con pH tra 5,2 e 9,8 e con temperature variabili da 4°C a 45°C, con una più alta frequenza tra 20°C e 35°C. Generalmente, le concentrazioni di *Aeromonas* nelle acque sembrano seguire un andamento stagionale: analisi di regressione multipla sembrano indicare che la sua crescita in acque clorate sia in rapporto alla temperatura dell'acqua – al di sopra di 14,5°C – e alla concentrazione di cloro – al di sotto di 0,3 mg/L. La sua presenza viene rilevata anche in assenza di *Escherichia coli* e difficile risulta stabilire un rapporto tra le sue densità e quelle degli indicatori di contaminazione fecale e degli eterotrofi cresciuti a 22°C e 37°C, soprattutto in acque poco inquinate e in acque potabili trattate e non trattate.

Riferimenti a valori limite per le concentrazioni del microrganismo nelle acque potabili sono quelli proposti dalle autorità sanitarie olandesi che raccomandano valori intorno a 200 UFC/100 mL (Unità Formanti Colonia) nelle acque durante la distribuzione e intorno a 20 UFC/100 mL nelle acque all'impianto di trattamento. Tuttavia, poiché il numero di *Aeromonas* spp. nelle acque in distribuzione è generalmente basso se comparato a quello rilevato negli alimenti (10^3 ÷ 10^5 UFC/g), l'esposizione (per contatto, ingestione) ad acque trattate in cui è presente *Aeromonas* probabilmente costituisce un rischio molto basso.

La ricerca dei microrganismi appartenenti a questo genere non è prevista dalla normativa italiana riguardante la determinazione della qualità delle acque destinate al consumo umano. Tuttavia, a causa del gran numero di segnalazioni relative alla presenza di *Aeromonas* nelle reti acquedottistiche, si ritiene opportuno fornire il metodo di analisi che ne permette la determinazione quantitativa.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica ISS A 014A rev. 00 viene utilizzata per la determinazione di *Aeromonas* spp. nelle acque da destinare e destinate al consumo umano.

2. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri appartenenti al genere *Aeromonas* che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione alla temperatura di $(28 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per (24 ± 2) ore, contare le colonie tipiche (*Aeromonas* presuntivo) e sottoporle a conferma.

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice).

4. Terreni di coltura e Reagenti

4.1. Substrato di isolamento

4.1.1. Terreno Selettivo di base m-*Aeromonas* Agar

Composizione		
Triptosio	5	g
Estratto di lievito	2	g
Destrina	11,4	g
Cloruro di sodio	3	g
Cloruro di potassio	2	g
Solfato di magnesio	0,1	g
Cloruro ferrico	0,06	g
Sodio desossicolato	0,1	g
Blu di bromotimolo	0,08	g
Agar	13	g
Acqua distillata	1000	mL
pH $8 \pm 0,2$		

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 e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per 15 min. Raffreddare a $(50 \pm 5) ^\circ\text{C}$ e aggiungere sterilmente una soluzione di Ampicillina (4.1.2.).

4.1.2. Soluzione di Ampicillina

Composizione	
Ampicillina	5 g
Acqua distillata	5 mL

L'antibiotico è anche disponibile in commercio in forma disidratata; reidratare, rispettando le comuni regole di asepsi, aggiungendo 5 mL di acqua distillata sterile. In alternativa sciogliere l'ampicillina in acqua distillata e sterilizzare per filtrazione. Aggiungere al substrato di isolamento (4.1.1.) già sterilizzato in ragione di 1 mL/100 mL di terreno.

Il prodotto è classificato come Xn - Nocivo. Può causare sensibilizzazione per contatto e inalazione. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

4.1.3. Terreno Selettivo completo m-Aeromonas Agar

Composizione	
Terreno Selettivo di base m-Aeromonas Agar (4.1.1.)	100 mL
Soluzione di ampicillina (4.1.2.)	1 mL

Al substrato di isolamento (4.1.1.) già sterilizzato aggiungere, rispettando le comuni regole di asepsi, la soluzione di ampicillina (4.1.2.) in ragione di 1 mL/100 mL di terreno. Mescolare e distribuire in capsule di Petri.

Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, a (5 ± 3) °C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Aeromonas hydrophila* ATCC 7965 e come controllo negativo *E. coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

4.2. Substrato di crescita

4.2.1. Triptone Soia Agar

Composizione	
Triptone	15 g
Peptone di soia	5 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	20 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,2±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 soluzione degli ingredienti. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a (121 ± 3) °C per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare.

Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, a (5 ± 3) °C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

4.3. Reagenti

4.3.1. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Composizione	
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. È da segnalare che tale prodotto viene classificato, ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

5. Procedura

5.1 Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 100 mL, è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

5.2. Filtrazione e incubazione

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con porosità nominale di 0,45 µm (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici da 0,7/0,2 µm). Porre la membrana sulla superficie del terreno di isolamento (4.1.3.) e procedere all'incubazione a (28 ± 1) °C per (24 ± 2) ore.

5.3. Identificazione e conteggio delle colonie

Sul substrato di isolamento (4.1.3.) i microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas* sviluppano, con viraggio del terreno, colonie di colore giallo, caratteristica dovuta alla fermentazione della destrina, ben distinguibili da colonie di altri microrganismi che possono crescere sullo stesso terreno. In alcuni casi sono infatti state individuate colonie bianche (*Alcaligenes* sp.), rosse (*Serratia* sp.) e verdi (*Pseudomonas* sp.). Contare tutte le colonie gialle tipiche come *Aeromonas* presuntivo.

6. Conferma

Per la verifica dell'appartenenza al genere *Aeromonas* è necessario procedere almeno 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 di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare, preferibilmente, tutte o comunque un numero rappresentativo di colonie sospette su Triptone Soia agar (4.2.1.) (4.2.7.) incubando a (28 ± 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 *Aeromonas* in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi.

Dal terreno Triptone Soia Agar (4.2.1.) prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia sospetta e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (4.3.1.) 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 una colorazione blu-violetto si sviluppa entro pochi secondi.

Aeromonas è ossidasi-positivo.

7. Espressione dei risultati

La concentrazione di *Aeromonas* spp. si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma, considerando l'eventuale diluizione e riportando il valore come numero per 100 mL di campione (N. /100 mL). Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati della prova di conferma, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

dove

<i>C</i>	numero di colonie che sono state confermate per 100 mL
<i>A</i>	numero di colonie confermate
<i>B</i>	numero di colonie sottoposte a conferma
<i>N</i>	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
<i>V_t</i>	volume di campione analizzato (in mL)
<i>V_s</i>	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
<i>F</i>	fattore di diluizione

Bibliografia

1. Havelaar AH, During M, Versteegh JFM. Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *J Appl Bacteriol* 1987;62:279-87.
2. Sartory D, Bonadonna L, Delattre JM, Gosling P, Janda M, and Van der Kooij D. *Aeromonas*. In: WHO (Ed.) *Guidelines for drinking-water quality. Addendum Microbiological agents in drinking water*. Geneva: World Health Organization; 2002. p.1-17.
3. Semproni M, Bonadonna L. Metodo per la ricerca e l'isolamento di *Aeromonas* sp. in acque destinate al consumo umano. *Notiziario dei metodi analitici, IRSA, Consiglio Nazionale delle Ricerche* 1997; Ottobre: 11-15.

DETERMINAZIONE DEGLI ENTEROVIRUS

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Enterovirus rilevato con il metodo ISS A 015A rev. 00.

I virus sono parassiti endocellulari obbligati e necessitano, quindi, di una cellula suscettibile all'infezione di cui utilizzano le risorse energetiche, enzimatiche e strutturali per riprodursi. Sono provvisti di un involucro proteico o lipoproteico che circonda un acido nucleico. Quest'ultimo è di un solo tipo: RNA (acido ribonucleico) o DNA (acido desossiribonucleico). Le proteine di rivestimento (capside) sono responsabili sia dell'attacco alla cellula suscettibile che dell'induzione di anticorpi specifici da parte del soggetto infettato.

La morfologia dei virus è estremamente variabile e dipende dal modo di assemblarsi delle varie subunità proteiche che costituiscono il capsido.

Gli enterovirus, e cioè tutti quelli che riconoscono la classica trasmissione oro-fecale, reperibili nell'ambiente appartengono a 6-7 famiglie e sono suddivisi in altrettanti generi; diversamente i sierotipi sono più di 100. Nel complesso le malattie causate dagli enterovirus sono diverse e dipendono strettamente dall'organo o apparato bersaglio colpito: gastroenteriti (Coronavirus, Astrovirus, Adenovirus, Rotavirus); paralisi (Poliovirus); meningiti (Coxsackievirus tipo A); miocarditi (Coxsackievirus tipo B); epatiti (virus dell'epatite A, virus dell'epatite E).

L'analisi virologica delle acque destinate ad uso umano o potabilizzate pone dei problemi nettamente differenti rispetto alle classiche analisi batteriologiche. Tali problemi sono legati ai volumi da analizzare e, di conseguenza, alla metodologia da adottare, alla mancanza di una metodica universalmente valida per tutti gli enterovirus e ai mezzi di identificazione dei virus isolati.

I volumi da analizzare sono nettamente superiori a quelli determinati per le analisi batteriologiche partendo da un minimo di 100 sino a 1000 litri. Inevitabilmente, la prima fase della concentrazione del campione da analizzare deve essere svolta su campo e poi proseguire in laboratorio. La stessa metodologia da adottare, sia su campo che in laboratorio, presenta numerose variabili e variazioni adottate dai singoli ricercatori.

In ultimo, merita particolare attenzione il problema legato all'isolamento e identificazione dei virus eventualmente presenti. Le metodiche classiche di sieroneutralizzazione con antisieri specifici, test di immunoenzimatica per la ricerca di antigeni virali (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ELISA) o test di immunofluorescenza sia diretta che indiretta sono stati in parte superati dai più rapidi e moderni test di biologia molecolare, quali il test di ibridazione molecolare e il test di reazione a catena della polimerasi (*Polymerase Chain Reaction*, PCR).

Nelle acque destinate al consumo umano la presenza di enterovirus è stata raramente riscontrata.

Nel Decreto legislativo 31/2001 e s.m.i. per questo parametro, inserito nell'Avvertenza, è prescritta l'assenza obbligatoria nell'acqua.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS A 015A rev. 00 vengono utilizzate per il rilevamento degli enterovirus nelle acque da destinare e destinate al consumo umano ed eventualmente nelle acque di piscina.

2. Principio del metodo

Nonostante la normativa richieda soltanto una determinazione qualitativa della presenza di enterovirus, i metodi di seguito descritti permettono di effettuare determinazioni qualitative e quantitative. I metodi riportati sono stati mantenuti sotto un unico codice per favorire la scelta della metodica più idonea in base alle specifiche competenze e disponibilità di attrezzature da parte degli operatori.

L'analisi virologica delle acque potabili e delle acque di piscina richiede il trattamento di grandi volumi di acque, difficili da trasportare in laboratorio. È quindi evidente che la metodica dovrà prevedere una fase di concentrazione su campo, al fine di ridurre il volume del campione, e una fase di concentrazione in laboratorio, al fine di ridurre ulteriormente il campione fino ad un volume adatto per l'infezione di colture cellulari.

3. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice) sono necessarie specifiche attrezzature. Di seguito saranno descritte solo le attrezzature principali che debbono essere presenti in un laboratorio di virologia ambientale, alcune delle quali di uso anche più comune.

3.1. Termostati

I termostati presenti in un laboratorio di virologia vengono utilizzati alla temperatura di $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ o diversamente indicato per particolari condizioni di crescita cellulare e/o virale. È da tenere presente che le cellule, che servono al mantenimento delle linee cellulari, devono essere incubate in termostati separati e non devono mai entrare in contatto con le cellule infettate o seminate con campioni ambientali potenzialmente infetti. È consigliabile predisporre ambienti separati e sprovvisti di climatizzazione forzata al fine di evitare una disseminazione nell'ambiente dei virus.

3.2. Cappe a flusso laminare

Anche in questo caso devono essere accuratamente separate le cappe per il mantenimento delle cellule sane da quelle per le cellule infette. Le cappe devono inoltre essere di tipo Biohazard per evitare una possibile trasmissione di patogeni virali all'operatore. A tal fine sono anche da preferire le cappe che offrano la possibilità all'operatore di introdurre solo le mani, separandolo dal piano di lavoro.

Le cappe a flusso laminare devono inoltre essere pulite routinariamente. La superficie di lavoro deve essere deterisa ogni giorno con alcool, con una soluzione di ipoclorito 0,1-0,2% o con altri detergenti idonei allo scopo. Una pulizia più energica può essere attuata mediante vapori di formaldeide, ottenuti utilizzando una piastra riscaldante e tenendo in funzione il flusso della cappa. È bene ricordare che i vapori di formaldeide sono estremamente tossici ed è quindi indispensabile che l'operatore si allontani durante la fase di disinfezione e che questa stessa sia attuata al termine della settimana lavorativa al fine di permettere l'evaporazione del disinfettante. Si attua periodicamente una volta ogni 2 mesi e comunque ogniqualvolta si verifici una contaminazione batterica delle colture cellulari.

3.3. Contenitori di azoto liquido

Servono per la conservazione di linee cellulari. Presso ogni laboratorio di virologia devono essere sempre disponibili più linee cellulari, in considerazione del fatto che non tutti gli enterovirus crescono su un'unica linea cellulare. Linee cellulari che non sono in uso in un dato momento possono essere congelate e conservate in azoto liquido per diversi anni. Per brevi periodi di tempo (massimo 6 mesi) è possibile conservare le cellule a circa $(-80) ^\circ\text{C}$.

3.4. Apparecchi per la produzione di acqua ultrapura

L'acqua per colture cellulari può essere prodotta sia per bidistillazione, mediante ebollizione, partendo da un'acqua preventivamente deionizzata o, meglio ancora, mediante apparati per la produzione di acqua ultrapura in genere provvisti anche di un ultrafiltro e di un sistema di deprogenazione.

A causa dell'aggressività di questo tipo d'acqua, è bene aggiungere immediatamente, all'acqua ultrapura sterile e raffreddata, il terreno 10x concentrato descritto di seguito.

3.5. Pompa peristaltica

È bene preferire, tra le diverse pompe in commercio, quelle a velocità e potenza regolabile.

3.6. Altre attrezzature

Frigorifero a (-20) °C e (-80) °C, centrifuga refrigerata veloce a 20.000 rpm, centrifuga refrigerata a 6000 rpm, centrifuga per provetta eppendorf, sistemi per la sterilizzazione a pressione positiva, ecc.

4. Metodi di indagine

In letteratura sono riportati numerosi metodi di concentrazione da diverse matrici ambientali. Tutti questi metodi sono altrettanto validi quanto difficilmente riproducibili e non applicabili a tutti gli enterovirus reperibili nell'ambiente. In effetti, la matrice ambientale così come il comportamento degli enterovirus può influenzare positivamente o negativamente un metodo o l'altro.

Nel complesso i metodi più comunemente utilizzati sono:

a) metodi di adsorbimento su flocculati o precipitati che comprendono l'uso del solfato di alluminio, solfato di ammonio, cloruro ferrico. Si tratta di metodi semplici ma di efficacia estremamente variabile;

b) ultrafiltrazione che si basa sull'utilizzo di membrane la cui porosità è inferiore alla taglia dei virus, tale metodo non necessita di pretrattamento o condizionamento delle acque prima della concentrazione;

c) adsorbimento-eluzione su supporti solidi che si basa sulla capacità dei virus di adsorbirsi a supporti e in seguito di staccarsi utilizzando condizioni differenti di pH o in presenza di soluzione organica. A tal fine si utilizzano membrane piane o a cartuccia a carica superficiale elettronegativa od elettropositiva, polvere di vetro, lana di vetro, polielettroliti insolubili, silicati minerali, carbone attivo. Il metodo di seguito descritto, è stato elaborato dalla letteratura internazionale disponibile e sulla base di personali esperienze. Niente vieta che il metodo possa essere modificato e adattato alle personali esigenze o di utilizzare uno o l'altro dei metodi di seguito descritti.

4.1. Reagenti e terreni di coltura

4.1.1. Estratto di carne al 3%, pH 7,2 e pH 9,5

Composizione	
Estratto di carne	3 g
Acqua ultrapura	100 mL

Agitare la soluzione con barretta magnetica. Portare il pH al valore desiderato con aggiunta di idrossido di sodio e sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 min.

La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

4.1.2. Estratto di carne allo 0,3% in glicina 0,05 M, pH 9,5

Composizione		
Estratto di carne	0,3	g
Glicina	0,38	g
Acqua ultrapura	100	mL

Agitare la soluzione con barretta magnetica e portare il pH a $(9,5 \pm 0,2)$ con aggiunta di idrossido di sodio. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 min.

La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

4.1.3. Soluzione di Formaldeide allo 0,1%

Composizione		
Formaldeide	13,5	mL
Acqua distillata	500	mL

Preparare al momento dell'uso, con le dovute cautele, e scartarla dopo l'utilizzo.

5. Campionamento

La presenza di cloro nelle acque potabili non costituisce un problema nell'analisi virologica per via della maggiore resistenza acquisita dai virus all'inattivazione sia nei confronti dei disinfettanti naturali che artificiali. In considerazione poi dell'elevato volume da analizzare è praticamente impensabile qualsiasi trattamento contro il cloro residuo se non utilizzando dei sistemi ad iniezione, ormai non più praticabili.

5.1. Fase su campo

Per questa fase possono essere utilizzati diversi sistemi, ma le membrane, così come le cartucce elettronegative che prevedono aggiunta di sali e acidificazione del campione mediante sistemi ad iniezione, non sono facilmente applicabili su campo. Tali membrane prevedevano l'acidificazione del campione a pH $(3,5 \div 4,0)$ e l'aggiunta di cloruro di alluminio o cloruro di magnesio a differenti concentrazioni, determinando recuperi estremamente variabili a causa della obbligata manipolazione del campione. Possono essere utilizzate membrane piane e cartucce a carica superficiale elettropositiva che operano in un campo di pH estremamente ampio, non necessitano di pre-acidificazione e aggiunta di sali, e possono essere collegate direttamente al rubinetto dell'acqua potabile per il prelievo del campione.

5.2. Concentrazione primaria

Montare la cartuccia a carica superficiale elettropositiva nell'apposito contenitore e collegare direttamente il contenitore al rubinetto di prelievo.

Aprire il rubinetto e regolare il flusso in uscita dal contenitore ad un rapporto di circa 15-17 L/min, applicando un regolatore del flusso idrico in entrata. In uscita è consigliabile applicare un contalitri. Il volume da filtrare è compreso tra 500 e 1000 litri.

Dopo il prelievo, mettere la cartuccia in una busta in plastica ed etichettarla indicando luogo, data del prelievo e il volume filtrato. Porre la cartuccia in una borsa termica sino al ritorno in laboratorio. In laboratorio è preferibile eluire la cartuccia immediatamente o comunque entro le 24 h conservandola a (5 ± 3) °C.

5.3. Fase in laboratorio

Al fine di ridurre il volume da seminare su colture cellulari è necessario, soprattutto quando si concentrino grandi volumi di acqua, procedere ad una seconda fase di concentrazione che può differenziarsi a seconda dei virus che si intendono ricercare o dell'eluente utilizzato per eluire la cartuccia.

5.4. Eluizione del virus adsorbito alla cartuccia

Per eluire correttamente una cartuccia sono necessari 1,2-1,5 L di eluente (4.1.2.) fatto ricircolare di continuo con l'ausilio di una pompa da laboratorio. In breve: collegare l'uscita della pompa all'entrata del contenitore per cartucce mentre il tubo di entrata della pompa deve pescare nella beuta contenente l'eluente. A sua volta l'uscita del contenitore deve ritornare, mediante un tubo flessibile, alla beuta.

Far fluire l'eluente per almeno 15 minuti e alla fine raccoglierlo svuotando completamente la cartuccia.

Neutralizzare l'eluente con acido cloridrico facendo attenzione che il pH sia intorno a $(7,0 \pm 0,2)$. L'acidificazione eccessiva dell'eluente, specie nel caso contenga estratto di carne, determinerebbe una precipitazione delle proteine e un'inattivazione dei virus eventualmente presenti.

6. Concentrazione secondaria degli enterovirus

La stessa metodica descritta nella prima fase di concentrazione (cartuccia elettropositiva) può essere anche utilizzata nella seconda fase utilizzando membrane, con diametro piuttosto piccolo (45 mm). Altri sistemi prevedono una precipitazione degli enterovirus eventualmente presenti: la flocculazione organica (nel caso di soluzioni di natura proteica), l'ultracentrifugazione, o la precipitazione con diversi agenti chimici quali il solfato di alluminio, il cloruro di alluminio o di ferro, l'idrossido di magnesio e il polietilenglicol 6000. Verranno descritte le tre metodiche più comunemente utilizzate: l'ultrafiltrazione, la flocculazione organica e la precipitazione con polietilenglicol 6000.

6.1. Reagenti

6.1.1. Estratto di carne al 3%, pH 7,2 e 9,5 (4.1.1.)

6.1.2. Soluzione di polietilenglicol 6000 al 50% (PEG) (p/v)

Composizione	
Soluzione salina fosfatata senza calcio e magnesio (11.5)	90 mL
Cloruro di sodio	12 g
PEG 6000	80 g

Portare a 160 mL di volume totale con la Soluzione salina fosfatata (PBS) (11.5.) senza calcio e magnesio. Aggiungere un magnete alla soluzione. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Una volta prelevata la soluzione dall'autoclave, mettere ad agitare per diverse ore (anche per tutta la notte) finché la soluzione non diventa limpida. La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

6.1.3. Soluzione di fosfato di sodio bibasico anidro 0,15 M

Composizione	
Fosfato di sodio bibasico anidro	2,4 g
Acqua ultrapura	100 mL

Sciogliere la soluzione utilizzando una barretta magnetica e sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

6.1.4 Soluzione di formaldeide allo 0,1% (4.1.3)

Preparare con le dovute cautele sotto cappa chimica.

6.1.5. Soluzione di Idrossido di sodio 0,1 N

Composizione	
Idrossido di sodio	4 g
Acqua distillata	1 L

Agitare vigorosamente con barretta magnetica fino a completa dissoluzione. Scartare dopo l'uso.

7. Ultrafiltrazione a flusso tangenziale

L'ultrafiltrazione è un processo di separazione delle particelle in funzione del solo peso molecolare; esistono diverse membrane con tagli molecolari (*nominal molecular weight limit*) da 1.000 sino a 1.000.000 di dalton. La funzione delle membrane è quella di porre una barriera tra le sostanze che riescono ad attraversare le membrane e le altre, a peso molecolare più elevato rispetto al taglio molecolare (cut-off), che sono ritenute, ad esempio, i virus. Nel caso specifico gli enterovirus vengono concentrati non per adsorbimento su membrane, ma per riduzione progressiva del volume del campione dovuto a perdita di acqua, sali e soluti in base al cut-off scelto. Le membrane attualmente in commercio sono di due tipi: cellulosa rigenerata e polisulfone, e possono essere a cartuccia (membrana avvolta a spirale) o a membrana piana.

Si consiglia l'uso di membrane con taglio molecolare pari a 100.000 dalton.

7.1. Preparazione del campione

Il campione non necessita di pretrattamenti sebbene, per migliorare il rendimento della membrana, è preferibile pretrattarla con estratto di carne al 3%, pH $(7,2 \pm 0,2)$ (4.1.1.) prevenendo così l'adsorbimento aspecifico dei virus.

7.2. Concentrazione

- Montare la membrana secondo le istruzioni della casa produttrice;
- Lavare la membrana con 5-10 L di acqua distillata al fine di allontanare il liquido conservante;
- Pretrattare il sistema con estratto di carne a pH $(7,2 \pm 0,2)$ (4.1.1.) facendolo ricircolare per 5 minuti;
- Far circolare il campione alle seguenti condizioni operative: 10-12 psi in entrata; rapporto ritenuto/filtrato (ultraconcentrato/scarto) 1: 5-7;
- Fermare l'apparecchio quando il recipiente del campione è quasi vuoto. In questo caso il volume del campione è rappresentato dal solo volume di riempimento dei tubi e di imbibizione della membrana. Svuotare il sistema completamente e raccogliere il campione;
- Lavare la membrana con una soluzione di estratto di carne al 3%, pH $(9,5 \pm 0,2)$ (4.1.1.) utilizzando un volume pari a 3/4 dell'ultraconcentrato;
- Riunire l'ultraconcentrato con la soluzione di lavaggio;
- Neutralizzare il pH del campione-concentrato finale;

- Il campione può essere ulteriormente concentrato se necessario, utilizzando sistemi di ultrafiltrazione in grado di trattare volumi minori di acqua, oppure mediante flocculazione organica (8.) o mediante precipitazione con polietilenglicol 6000 (9.).
- A fine campionamento:
- Lavare la membrana con 1-2 L di acqua distillata;
- Far circolare in continuo per almeno 15 minuti una soluzione di sodio idrossido allo 0,1 N (6.1.5.);
- Lavare la membrana con 2-3 L di acqua distillata.

A questo punto la membrana può essere utilizzata per un nuovo campione (7.2.) o conservata per successive analisi, facendo circolare in continuo una soluzione di formaldeide allo 0,1% (6.1.4.) per almeno 5-10 minuti.

Spegnere la pompa ed estrarre la membrana cercando di conservare quanta più formaldeide possibile all'interno della membrana, al fine di evitare l'essiccamento della stessa. Riporre in idoneo contenitore aggiungendo formaldeide come liquido conservante.

8. Flocculazione organica

Questa tecnica si basa sulla capacità delle proteine di precipitare a pH acido e comunque inferiore al loro punto isoelettrico. I virus presenti nel campione sono imprigionati nei flocculati e raccolti per semplice centrifugazione.

Questa metodica è applicabile solo a soluzioni proteiche o comunque rese tali per semplice aggiunta di estratto di carne. La flocculazione organica va attentamente controllata per impedire una caduta eccessiva del pH che inattiverebbe i virus presenti (ad esempio, i Rotavirus). Esistono in commercio estratti di carne purificati che migliorano il rendimento della flocculazione organica.

8.1. Concentrazione

Portare la soluzione proteica lentamente a pH ($3,5 \pm 0,2$) e mantenere costantemente in agitazione lenta per 30 min. Recuperare il flocculato per semplice centrifugazione a 3500 g per 30 min a (5 ± 3) °C. Risospendere il pellet in una soluzione sterile di fosfato di sodio bibasico anidro 0,15 M, pH 7,2 (6.1.3.). Dopo dissoluzione del pellet riportare il pH a ($7,2 \pm 0,2$) con l'aggiunta di idrossido di sodio.

9. Polietilenglicol 6000 (PEG)

Il PEG è un polimero sintetico solubile in acqua e atossico su colture cellulari. Il PEG determina una polimerizzazione delle molecole di acqua intorno alle proteine, e quindi ai virus, causandone una precipitazione. Può essere utilizzato sia con soluzioni proteiche che saline.

9.1. Concentrazione

Porre il campione, addizionato con una soluzione di polietilenglicol 6000 al 50% (6.1.2.), in rapporto di 1:4 (vol/vol) (concentrazione finale 10%), a (5 ± 3) °C, in agitazione lenta per una notte.

Risospendere il precipitato, spesso invisibile, raccolto per centrifugazione a 10.000g per 45 minuti a (5 ± 3) °C, nel minor volume possibile (2-3 mL) di PBS sterile pH ($7,2 \pm 0,2$) (11.5.).

I tempi di centrifugazione sono proporzionali ai volumi da centrifugare, in genere per volumi da 50 a 100 mL sono necessari 45-60 minuti. Per volumi superiori (200-250 mL) si può arrivare anche alle 2 ore.

La precipitazione con PEG, che richiede l'utilizzo di una centrifuga ad alta velocità, è un processo meno drastico rispetto alla flocculazione organica.

10. Isolamento e identificazione di enterovirus

I metodi per la ricerca degli enterovirus da campioni ambientali comprendono diversi sistemi: sistemi biologici (inoculazione su colture cellulari), sistemi immunologici (immunofluorescenza diretta e indiretta, test immunoenzimatici, test radioimmunologici) e sistemi molecolari (sonde molecolari o probes, test di reazione a catena della polimerasi).

Molti di questi test sono già commercializzati ma, in alcuni casi, richiedono una certa esperienza da parte dell'operatore. Tutti i test immunologici si basano sull'utilizzo di un anticorpo marcato con radioattivo, fluoresceina o con un enzima.

Altri test immunoenzimatici, come ad esempio il test di immunomicroscopia elettronica, difficilmente possono essere applicabili all'ambiente in quanto la loro bassa sensibilità richiede un'elevata concentrazione virale, necessaria per una risposta positiva, difficilmente raggiungibile in campioni ambientali.

11. Colture cellulari

I virus umani sono parassiti strettamente endocellulari, quindi necessitano di cellule su cui moltiplicarsi. Alcuni virus, come i Poliovirus, possono moltiplicarsi su diverse linee cellulari, mentre altri virus presentano una specificità cellulare stretta. Infine, per un terzo gruppo di enterovirus, non esiste al momento una linea cellulare adatta e non sono quindi evidenziabili se non con altri sistemi più sofisticati delle colture cellulari. Alcuni virus, capaci di moltiplicarsi su sistemi cellulari, sono in grado di indurre un tipico effetto citopatico (Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus), altri (Epatite A, Rotavirus) possono moltiplicarsi senza indurre alcuna alterazione evidente. In quest'ultimo caso la loro presenza può essere svelata solo con test immunologici (immunofluorescenza diretta o indiretta, test immunoenzimatici, test radioimmunologici) o di biologia molecolare (ibridazione, reazione a catena della polimerasi).

E' buona norma, che tutti i laboratori di virologia ambientale, abbiano a disposizione più di una linea cellulare a seconda del virus che si intende ricercare. Le linee cellulari sono classificabili in tre gruppi: cellule di primo espianto, linee cellulari continue (le più utilizzate) e cellule diploidi. Le modalità di coltivazione, di subcoltivazione, di congelamento in azoto liquido per il mantenimento a lungo termine delle linee cellulari sono estremamente complesse e prima di avventurarsi al mantenimento e all'uso di cellule per l'isolamento da campioni ambientali, è assolutamente indispensabile un approfondito training in laboratori specializzati.

Le cellule vengono fatte crescere su supporti solidi (fiasche) in plastica speciale per colture cellulari di dimensioni variabili da 12,5 cm² sino a 175 cm², o in roller (fiasche tonde in rotazione continua) da 500 cm². Le cellule possono essere anche coltivate in tubi, in piastre da 2 a 96 pozzetti o in capsule di Petri in genere da 45 a 90 mm di diametro.

I monostrati cellulari ad intervalli regolari e variabili, a seconda delle diverse linee cellulari, devono essere separati nelle loro singole cellule da utilizzare per la preparazione di altri monostrati cellulari.

Qui di seguito verrà dato, a titolo di esempio, la produzione di nuovi monostrati cellulari a partire da monostrati di 25 cm².

11.1. Reagenti e terreni di coltura

11.1.1. Stock 10x

In commercio sono disponibili sia terreni già pronti che in polvere. Questi ultimi richiedono la reidratazione della polvere in acqua ultrapura, utilizzando 1/10 del volume indicato al fine di ottenere una soluzione 10x. Aggiungere 1 mL dello *stock* di antibiotici (11.1.3.) e mettere ad agitare per almeno 2 ore al fine di favorire la completa dissoluzione della polvere. Sterilizzare per filtrazione a pressione positiva utilizzando un gas inerte come l'azoto. La composizione del terreno può variare a

seconda delle esigenze nutrizionali delle cellule o a seconda del loro utilizzo (con o senza rosso neutro).

Il terreno così preparato può essere mantenuto a (5 ± 3) °C per non più di 6 mesi in condizioni ottimali.

11.1.2. Siero vitello fetale

Trattare i flaconi di siero di vitello a (56 ± 1) °C per 45 minuti.

11.1.3. Pool di antibiotici

La composizione che viene indicata è una miscela ricca che può essere variata a seconda delle necessità, ad esempio aggiungendo antimicoplasmici in caso di presente o accertata contaminazione delle linee cellulari.

Composizione	
Kanamicina	0,5 g
Streptomicina	6 g
Penicillina	5000000 unità
Micostatin	160000 unità
Acqua ultrapura	50 mL

Agitare la miscela con barretta magnetica per diverse ore e sterilizzare per filtrazione a pressione positiva. Distribuire la miscela in aliquote di 3-5 mL, congelare a (-20 ± 1) °C e utilizzare per non oltre 6 mesi.

11.1.4. Soluzione di Bicarbonato di sodio all'8%

Composizione	
Bicarbonato di sodio	32 g
Acqua ultra pura	400 mL

Agitare con barretta magnetica per 30 minuti e sterilizzare per filtrazione positiva.

Il bicarbonato deve essere conservato a (5 ± 3) °C, in flacone chiuso e al riparo dalla luce. Non può essere conservato a lungo (massimo 3-4 settimane). Al momento dell'aggiunta al terreno di coltura si deve notare un viraggio di colore che può andare dal rosso pallido al rosso più intenso (dipende dalla costituzione del terreno); un viraggio verso il viola deprime per uno scarto immediato sia dello *stock* di bicarbonato che del flacone di terreno al quale il bicarbonato stesso è stato aggiunto.

11.1.5. Soluzione di Glutamina al 3%

Composizione	
Glutamina	12 g
Acqua ultrapura	400 mL

Agitare con barretta magnetica per almeno 30 minuti e sterilizzare per filtrazione positiva. Distribuire in aliquote e congelare a becco di clarino a (-20 ± 1) °C. Può essere conservata per non più di 6 mesi in condizioni ottimali.

11.1.6. Miscela di tripsina - EDTA

Composizione	
Soluzione salina fosfata (phosphate buffered salts, PBS) senza calcio e magnesio (11.5.)	1000 mL
Tripsina	2,5 g
EDTA (acido etilendiamino-tetra-acetico)	0,2 g

La soluzione salina è disponibile in commercio in polvere o pastiglie da sciogliere in acqua ultrapura. Agitare con barretta magnetica per almeno 2 ore e sterilizzare per filtrazione positiva.

Distribuire in aliquote da 100 mL e congelare a (-20 ± 1) °C. Può essere conservata per non più di 3 mesi in condizioni ottimali.

Prima dell'uso la tripsina deve essere riscaldata a (36 ± 1) °C in bagno termostato. Nel caso in cui i 100 mL di soluzione non siano utilizzati completamente, il flacone può essere conservato per non più di 2 settimane a (5 ± 3) °C.

11.2. Terreni di crescita e di mantenimento

I terreni di crescita sono utilizzati per la moltiplicazione delle cellule, diversamente i terreni di mantenimento sono utilizzati su monostrati cellulari già formati.

11.2.1. Terreno di crescita al 10% di siero di vitello fetale

Composizione		
Acqua ultrapura sterile		400 mL
Terreno 10x specifico per la linea cellulare utilizzata (11.1.1.)	50	mL
Siero di vitello fetale inattivato (11.1.2.)	50	mL
Antibiotici (11.1.3.)	0,5	mL
Bicarbonato sodico all'8% (11.1.4.)	7	mL
Glutamina al 3% (11.1.5.)	5	mL

Etichettare accuratamente la bottiglia di terreno indicando: tipo di terreno, percentuale di siero di vitello fetale, linea cellulare e data di preparazione.

Il terreno 10x può variare a seconda delle esigenze nutrizionali delle diverse linee cellulari; alcune richiedono terreni particolarmente arricchiti, ad esempio zuccheri, aminoacidi non-essenziali. Può essere conservato a (5 ± 3) °C per non più di 6 mesi. E' bene comunque prima del suo utilizzo controllare l'assenza di crescita batterica che si evidenzia con un precipitato sul fondo della bottiglia.

11.2.2. Terreno di mantenimento al 2% di siero di vitello fetale

Composizione		
Acqua ultrapura sterile	420	mL
Terreno 10x specifico per la linea cellulare utilizzata (11.1.1.)	50	mL
Siero di vitello fetale inattivato (11.1.2.)	10	mL
Antibiotici (11.1.3.)	0,5	mL
Bicarbonato sodico all'8% (11.1.4.)	14	mL
Glutamina al 3% (11.1.5.)	5	mL

Etichettare la bottiglia come per il terreno di crescita.

I terreni sia di crescita che di mantenimento vanno utilizzati entro 2 mesi dalla data di preparazione.

11.2.3. Terreno di mantenimento doppio concentrato (2x)

Composizione		
Acqua ultrapura sterile	340	mL
Terreno 10x specifico per la linea cellulare utilizzata e privo di rosso neutro (11.1.1.)	100	mL
Siero di vitello fetale inattivato (11.1.2.)	20	mL
Antibiotici (11.1.3.)	1	mL
Bicarbonato sodico all'8% (11.1.4.)	28	mL
Glutamina al 3% (11.1.5.)	10	mL

Etichettare la bottiglia come per il terreno di crescita. Il terreno va utilizzato entro 2 mesi dalla data di preparazione.

11.3. Agar per colture cellulari all'1,8%

Composizione		
Agar per colture cellulari	1,8	g
Acqua ultrapura	100	mL

Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Può essere conservato a (5 ± 3) °C per non più di 6 mesi. Se l'agar è troppo vecchio si può notare una certa difficoltà a solidificare.

11.4. Rosso neutro all'1%

Composizione		
Rosso neutro	1	g
Cloruro di sodio	8,5	g
Acqua ultrapura	100	mL

Sciogliere la soluzione utilizzando una barretta magnetica e sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 min. Distribuire sterilmente in aliquote. Può essere conservato a temperatura ambiente per non più di 6 mesi. Non agitare mai prima dell'uso al fine di evitare la risospensione di eventuali cristalli di colore che potrebbero interferire con la lettura.

11.5. Soluzione salina fosfatata (PBS) con o senza calcio e magnesio

In commercio esistono polveri e/o pastiglie da sciogliere direttamente in acqua ultrapura. Sciogliere la polvere o le pastiglie nella quantità di acqua ultrapura indicata in confezione. Dopo agitazione con barretta magnetica, sterilizzare in autoclave il PBS senza calcio e magnesio a (121 ± 3) °C per 15 minuti e per pressione positiva il PBS con calcio e magnesio. La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

11.6. Soluzione di cristal violetto allo 0,15%

Composizione		
Cristal violetto	0,15	g
Acqua ultrapura	100	mL

Sciogliere la soluzione utilizzando una barretta magnetica e sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

12. Preparazione di monostrati cellulari partendo da una fiasca da 25 cm²

- Eliminare il terreno di mantenimento (11.2.2.);
- Lavare il monostrato cellulare con PBS sterile senza Calcio e Magnesio (11.5.);
- Aggiungere (5÷7) mL di Tripsina-EDTA (11.1.6.) preriscaldata a (36 ± 1) °C in bagno termostato;
- Controllare al microscopio rovesciato il momento in cui le cellule iniziano a separarsi le une dalle altre assumendo una forma tondeggianti;
- Eliminare la soluzione Tripsina-EDTA;

- Sbattere vigorosamente la fiasca sul palmo della mano controllando visivamente, in controluce, il distacco del tappeto dal supporto;
- Aggiungere immediatamente (5÷6) mL di terreno di crescita (11.2.1.) e con l'ausilio di una pipettrici automatica risospendere le cellule;
- Distribuire, in parti uguali, il terreno contenente le cellule in 3 o più fiasche a seconda delle linee cellulari utilizzate;
- Aggiungere altro terreno di crescita (11.2.1.) a finale (7÷8) mL per fiasca. L'area di crescita cellulare deve essere coperta dal terreno;
- Incubare le cellule a (36 ± 1) °C; il nuovo monostrato cellulare sarà completo nell'arco di (36÷48) ore;
- A monostrato formato, eliminare il terreno di crescita e aggiungere (7÷8) mL di terreno di mantenimento (11.2.2.). Quest'ultimo deve essere periodicamente cambiato quando il colore del terreno virerà verso il giallo.

Particolare cura deve essere posta al momento della separazione delle cellule con Tripsina-EDTA (11.1.6.), il tempo di contatto è estremamente variabile e dipende dalle diverse linee cellulari. Nel caso in cui le cellule si disperdano nella soluzione Tripsina-EDTA (11.1.6.) deve essere immediatamente aggiunto terreno di crescita (11.2.1.). Nel siero è presente un inibitore della Tripsina che, se fosse lasciata agire troppo a lungo, porterebbe ad una digestione della stessa parete cellulare e alla morte delle cellule. Nel caso in cui le cellule siano sospese in Tripsina-EDTA, possono essere raccolte per semplice centrifugazione (3500 rpm per 15 minuti, a temperatura ambiente) e il pellet risospeso in terreno di crescita (11.2.1.).

13. Inoculo di colture cellulari

La ricerca di enterovirus può effettuarsi per isolamento su colture cellulari in vitro, per tecniche immunologiche e per tests di biologia molecolare.

I campioni comunque concentrati presentano una notevole quantità di batteri che vanno eliminati prima dell'inoculo sulle cellule. Inoculare 0,5 mL di campione per fiasche da 25 cm² e aggiungere un ugual volume di terreno di mantenimento (diluizione finale 1:2). La quantità di campione che può essere inoculata su monostrati cellulari dipende strettamente dalla tossicità del campione (in alcuni casi è consigliabile ricorrere a diluizioni superiori - 1:7-1:10 - come nel caso di omogenati di mitili o fanghi).

13.1. Decontaminazione per filtrazione

Esistono in commercio filtri già pre-assemblati e a basso adsorbimento proteico.

- Pretrattare il filtro, utilizzando una siringa sterile, da 0,22 µm e di 12 mm di diametro con (4÷5) mL di estratto di carne (4.1.1.) a pH 7,2±0,2 o con terreno di crescita (11.2.1.) al fine di prevenire l'adsorbimento aspecifico dei virus;
 - Filtrare il campione e raccoglierlo in un contenitore sterile;
 - Aggiungere un *pool* di antibiotici (11.1.3.) in rapporto 1:50 e incubare per 2 h a (36 ± 1) °C.
- Il diametro del filtro può variare in base alla torbidità e al volume del campione.

13.2. Decontaminazione con cloroformio

- Aggiungere al campione cloroformio a concentrazione finale pari al 30%;
- Agitare vigorosamente per (15÷20) minuti;
- Centrifugare a 3500 rpm per 15 min a temperatura ambiente;
- Prelevare accuratamente e sterilmente la fase acquosa;
- Aggiungere alla fase acquosa un *pool* di antibiotici (11.1.3.), in rapporto 1:50;
- Mettere il campione per 2 ore a (36 ± 1) °C.

14. Isolamento di virus citopatici

L'isolamento su monostrato cellulare può essere effettuato in due modi. Dopo inoculo del campione sul monostrato cellulare e successivo adsorbimento del virus si può aggiungere: terreno liquido (metodo qualitativo: presenza/assenza, per volume di inoculo) o addizionato con agar (metodo quantitativo: Unità Formanti Placche, per volume di inoculo).

14.1. Inoculo su monostrati in terreno liquido

- Preparare monostrati cellulari in fiaschette da 25 cm² o superiori;
- Eliminare il terreno di crescita;
- Inoculare il campione precedentemente trattato;
- Lasciare a contatto il campione (adsorbimento) per (1÷2) ore a (36 ± 1) °C in agitazione lenta, ma continua utilizzando un agitatore basculante;
- Osservare al microscopio invertito l'eventuale effetto tossico del campione (distruzione del monostrato non imputabile a virus). In caso di elevata tossicità, l'inoculo del campione va ripetuto, su nuovo monostrato, a diluizione maggiore;
- In caso di assenza di tossicità, eliminare l'inoculo e lavare il monostrato cellulare con terreno di mantenimento (11.2.2.) o soluzione salina sterile completa di calcio e magnesio (11.5.);
- Aggiungere (6÷7) mL di terreno di mantenimento (11.2.2.) per fiasche da 25 cm²;
- Incubare a (36 ± 1) °C e osservare le cellule giornalmente al fine di evidenziare un effetto citopatico da virus.

Dopo una notte di incubazione si può presentare un effetto tossico ritardato, seppur minimo. È necessario affiancare alle analisi in corso, almeno 2 fiaschette di cellule non infettate e trattate allo stesso modo delle cellule infette (controllo cellule). Le colture debbono essere osservate per almeno 2 settimane. L'effetto citopatico da virus deve essere confermato con un secondo passaggio, inoculando un aliquota del lisato cellulare del primo passaggio (previo congelamento e scongelamento per almeno tre volte) su un nuovo monostrato cellulare.

14.2. Inoculazione su monostrati mantenuti in terreni agarizzati

Questa tecnica può essere applicata solo per quei virus che provocano placche visibili di lisi.

15. Metodo delle placche in presenza di colorante vitale

- Preparare monostrati cellulari su capsule di Petri da 100 mm di diametro;
- Trattare il campione e inoculare come sopra (13.) incubando le capsule di Petri per colture cellulari in atmosfera di 5% di biossido di carbonio;
- Eliminare l'inoculo e lavare il tappeto con una soluzione salina sterile completa di calcio e magnesio (11.5.);
- Aggiungere 10 mL di terreno di mantenimento doppio concentrato (11.2.3.) addizionato con agar (11.3.) (50% - 50%);
- Dopo solidificazione, aggiungere un secondo strato di terreno doppio concentrato (11.2.3.) agarizzato (11.3.) contenente rosso neutro (11.4.) allo 0,1%;
- Dopo solidificazione del secondo strato incubare le piastre a (36 ± 1) °C in atmosfera di 5% di biossido di carbonio.

Il colorante vitale determina una colorazione rosso pallido del monostrato integro, mentre le placche di lisi sono visibili come foci rotondi non colorati.

16. Metodo delle placche in assenza di colorante vitale

- Trattamento, inoculo e aggiunta del terreno agarizzato (11.2.3.; 11.3.) (senza colorante vitale) e incubazione sono eseguiti come precedentemente detto;
 - Dopo (3÷5) giorni le cellule sono fissate per aggiunta di 3 mL di 10% acidotricloroacetico;
 - Dopo 20 min di contatto, l'agar è eliminato e le cellule colorate con (1÷2) mL di una soluzione di cristal violetto (11.6.);
 - Dopo 10 minuti le capsule sono lavate con soluzione salina (11.5.) e asciugate.
- Il tappeto intatto si presenta colorato in viola, mentre le placche di lisi sono trasparenti.

17. Isolamento di virus che non provocano effetto citopatico

Alcuni virus possono moltiplicarsi senza indurre un'alterazione visibile del tappeto cellulare (Rotavirus), altri virus crescono con estrema difficoltà e con tempi di incubazione lunghi anche diverse settimane, ad esempio Epatite A.

Tutti questi virus possono essere messi in evidenza con tecniche immunologiche di immunofluorescenza diretta o indiretta ed i radio-immuno focus assay (RIFA).

Verrà descritto solo il metodo dell'immunofluorescenza in quanto il metodo RIFA è simile al primo con la differenza della marcatura radioattiva dell'anticorpo; nell'immunofluorescenza l'anticorpo è marcato con fluoresceina (sostanza fluorescente).

Ogni test deve sempre comprendere dei controlli negativi (cellule non infettate) e controlli positivi (cellule infettate con ceppi virali noti di laboratorio).

17.1. Metodo dell'immunofluorescenza diretta

- Preparare il monostrato cellulare su vetrini per immunofluorescenza;
- Il campione è inoculato come nell'inoculo su monostrati con terreno liquido (14.1.);
- Incubare i vetrini in atmosfera di 5% di biossido di carbonio per un tempo variabile dipendente dal periodo di replicazione del virus;
- Lavare il monostrato cellulare con soluzione salina sterile completa di calcio e magnesio (11.5.);
- Fissare il vetrino per 10-15min in acetone a freddo (-20 ± 1) °C;
- Lavare con una soluzione salina sterile completa di calcio e magnesio (11.5.) e asciugare all'aria;
- Aggiungere un anticorpo fluoresceinato e specifico contro l'antigene virale che si intende ricercare mantenendo per circa 45 minuti a (36 ± 1) °C in camera umida;
- Lavare il vetrino con una soluzione salina sterile completa di calcio e magnesio (11.5.) ed esaminarlo con un microscopio a fluorescenza.

La positività è data dall'evidenziazione di punti verdi fluorescenti in genere intracitoplasmatici. La positività può essere espressa come percentuale di cellule infette o numero di foci fluorescenti.

17.2. Metodo dell'immunofluorescenza indiretta

Il metodo prevede l'utilizzo di due anticorpi: il primo anticorpo è un'immunoglobulina non marcata e specifica verso un determinato virus; il secondo anticorpo è un'anti-immunoglobulina marcata con fluoresceina. In commercio sono reperibili entrambi i tipi di anticorpi.

- La preparazione del tappeto cellulare, l'infezione e il fissaggio viene eseguita come nel test precedente (14.1.);
- Aggiungere il primo anticorpo e incubare per 45 minuti a (36 ± 1) °C in camera umida;
- Lavare 2 volte con soluzione salina sterile completa di calcio e magnesio (11.5.);

- Aggiungere il secondo anticorpo marcato con fluoresceina mantenendo per circa 45 minuti a (36 ± 1) °C in camera umida);
- Lavare con soluzione salina sterile completa di calcio e magnesio (11.5.) e osservare al microscopio a fluorescenza.

La positività viene espressa come nel caso dell'immunofluorescenza diretta.

17.3. Metodo immunoenzimatico

Nel metodo immunoenzimatico (ELISA) l'anticorpo specifico verso un determinato antigene è adeso alla fase solida (piastre per test ELISA a 96 pozzetti). Esistono oramai in commercio numerosi test enzimatici per la ricerca dei virus isolabili dall'ambiente.

Viene descritto un metodo standard di tipo diretto per la ricerca del virus dell'epatite A. In ogni test vanno sempre inclusi almeno due controlli positivi e due negativi forniti nel kit commerciale insieme alle soluzioni specifiche da utilizzare nel test.

- Lavare il pozzetto con la soluzione di lavaggio;
- Mettere 100 µL del campione in esame;
- Incubare per (16 ± 2) ore a temperatura ambiente in camera umida;
- Lavare i pozzetti per almeno 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio;
- Mettere 100 µL dell'anticorpo marcato;
- Incubare a (36 ± 1) °C per 1 ora in camera umida;
- Lavare almeno 3 volte con 300 µL della soluzione di lavaggio;
- Aggiungere 100 µL di una soluzione contenente un appropriato substrato specifico per l'enzima legato all'anticorpo;
- Lasciare 30 minuti a temperatura ambiente in camera umida;
- Bloccare la reazione con 100 µL di una soluzione di acido cloridrico 0,1 N.

L'avvenuto legame anticorpo-antigene (positività) è evidenziato dallo sviluppo di una reazione cromatica tra substrato ed enzima. I campioni sono considerati positivi sulla base delle indicazioni fornite dalla casa produttrice.

18. Test di biologia molecolare

Analisi di biologia molecolare possono essere eseguite sia sul campione concentrato (senza passaggio su monostrati cellulari) sia dopo passaggio su cellule.

L'analisi virologica ambientale ha mostrato nel corso degli ultimi anni notevoli cambiamenti non tanto per il trattamento del campione quanto per l'isolamento e identificazione dei virus enterici. I metodi classici legati alla microscopia elettronica, all'isolamento su sistemi cellulari, ai test che utilizzano anticorpi quali l'immunofluorescenza o i test Elisa, sono stati in gran parte sostituiti dai test bio-molecolari quali il test di ibridazione molecolare o la più recente reazione di amplificazione genomica (Polymerase chain reaction o PCR).

L'obbligatoria natura di parassiti endocellulari ha reso necessario l'uso di sistemi cellulari su cui moltiplicare i virus enterici. Sfortunatamente solo una minima parte di essi sono cellule-adattati, mentre per la maggior parte non è disponibile un sistema cellulare idoneo. Inoltre l'isolamento su sistemi cellulari è costoso, piuttosto laborioso e necessita il mantenimento di più linee cellulari contemporaneamente. Per questi motivi i ricercatori ambientali si sono indirizzati verso metodiche molecolari più rapide e sensibili dei metodi tradizionali.

Questi sistemi comprendono le sonde molecolari o probes sia a DNA, acido deossiribonucleico, che RNA, acido ribonucleico, (test di ibridazione) e più recentemente la reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR). Tali tecniche hanno ricevuto un notevole sviluppo, sebbene entrambe non siano in grado di discriminare tra particelle virali infettive e non.

Le sonde molecolari sono costituite da RNA o DNA complementare ad una sequenza specifica e unica del genoma virale. L'uso delle sonde molecolari per la ricerca degli enterovirus ha avuto il merito di

avere introdotto tecniche di biologia molecolare nel campo ambientale, ma presenta un unico limite legato alla loro sensibilità che le rende applicabili solo ad acque con alto titolo virale (limite di sensibilità: 10^3 particelle virali infettive).

Per rendere visibile il segnale di ibridazione tra sonda e genoma bersaglio è necessario associare alla reazione un sistema di rivelazione. Le prime sonde utilizzate furono marcate con tracciante radioattivo; l'isotopo di scelta è stato il ^{32}P in quanto garantiva le migliori prestazioni in termini di sensibilità, pur presentando breve emivita (14,3 giorni), obbligando necessariamente a marcare la sonda al momento del test con tempi lavorativi piuttosto lunghi. Inoltre, l'impiego del tracciante radioattivo impone laboratori attrezzati e dedicati, un'attenzione particolare all'uso di questi materiali e un adeguato smaltimento delle scorie radioattive (3).

Viste tali limitazioni, il tracciante radioattivo fu successivamente sostituito da sonde marcate "a freddo" con enzimi capaci di catalizzare la trasformazione di sostanze solubili in insolubili e colorate che precipitavano sullo spot di ibridazione.

Il test di reazione a catena della polimerasi (PCR) consiste in un'amplificazione selettiva di una porzione unica e specifica del genoma secondo una relazione del tipo 2^n , con n uguale al numero di cicli di amplificazione. Alla fine del test la sequenza risulta copiata da appositi enzimi fino ad un massimo di 106 copie. L'amplificato può essere successivamente risolto e identificato sia su gel di agarosio, in quanto, essendo nota la sequenza, se ne conosce anche dimensione e peso molecolare, sia mediante test di ibridazione molecolare su supporto solido utilizzando apposite sonde marcate (test di ibridazione).

Sfortunatamente, tutte le matrici ambientali presentano inibitori sia per la reazione di amplificazione genica che di trascrittasi inversa dell'RNA genomico. Diversi metodi sono stati proposti per eliminare o almeno ridurre gli inibitori quali: il pellettamento del virus mediante ultracentrifugazione o precipitazione con PEG, per la purificazione dell'acido nucleico: guanidina isotiocianato, colonne in silice, colonne con poly-dT, filtri con polvere di vetro, precipitazione alcoolica, ecc. È interessante riferire come Jansen abbia messo a punto un metodo di estrazione di HAV da campioni ambientali rivestendo le provette con anticorpi monoclonali (Antigen-Antibody Capture Method). Il test ha permesso, mediante un semplice lavaggio delle provette, l'eliminazione di tutti gli inibitori presenti. Il metodo di Jansen è estremamente semplice ma causa indirettamente la perdita di tutte le eventuali varianti genotipiche (e indirettamente antigeniche) che non fossero riconosciute dal monoclonale.

Poiché la Taq polimerasi è in grado di amplificare solo DNA, l'identificazione di virus ad RNA (virus enterici, astrovirus, rotavirus, ecc.) richiede la trasformazione dell'RNA genomico in cDNA (complementary DNA) mediante l'utilizzo di una trascrittasi inversa, o DNA polimerasi RNA dipendente (enzima di retrotrascrizione isolato da Retrovirus), e di un primer oligonucleotidico.

Il metodo per la rivelazione del DNA amplificato consiste nella corsa elettroforetica in un campo elettrico a intensità e direzione costante, su gel d'agarosio, colorazione del DNA con etidio bromuro e visualizzazione ai raggi UV.

Per aumentare la sensibilità di un saggio PCR è possibile allestire una *nested*-PCR, dove ad una reazione di amplificazione iniziale può seguire una seconda reazione di polimerizzazione. Tale tecnica si è andata diffondendo sebbene presenti un più elevato rischio di cross-contaminazione dei campioni e quindi di false positività. Nel corso di questi ultimi anni, accanto alla tecnica di base di amplificazione si sono sviluppate numerose procedure quali la PCR multiplex che consiste nell'amplificazione contemporanea, in una stessa reazione, di più sequenze genomiche bersaglio, riducendo quindi il volume del campione di partenza. In questo test deve essere posta particolare cura nella scelta delle dimensioni del campione, nella standardizzazione della miscela di amplificazione, nel rischio di formazione di dimeri-trimeri dei primer, nelle temperature di esercizio dei diversi primer che devono essere simili tra loro.

Nel corso degli ultimi anni, sono state proposte altre tecniche di amplificazione che, tuttavia, non hanno trovato largo impiego, quali la LCR (Ligase Chain Reaction), la Q β (Q-Beta Replicase) e il NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*). La LCR si basa sull'impiego di ligasi termostabili e permette la discriminazione di sequenze di DNA che differiscono tra loro per singole paia di basi; la Q-Beta Replicasi permette di amplificare frammenti genici mediante l'uso di RNA polimerasi-RNA dipendenti in grado di replicare specifici filamenti di molecole ad RNA e quindi di sintetizzare grosse quantità di prodotto a partire da piccole quantità di filamento stampo; infine, la più

recente tecnica del NASBA consiste in un'amplificazione del genoma virale a temperatura costante ed è stato applicato allo studio di diversi virus sia a DNA sia a RNA.

La possibilità di quantificare, mediante saggi di quantificazione le copie del genoma virale presenti nel campione rappresenta un'applicazione di notevole importanza nel valutare la riduzione della carica virale nei processi di trattamento delle acque reflue e potabili, nella stabulazione dei mitili, ecc.

La PCR, oltre a rappresentare un valido metodo di amplificazione genomica, costituisce la base di partenza per genotipizzare i virus isolati. La genotipizzazione può essere condotta mediante determinazione dei polimorfismi del DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism o RFLP); il principio del metodo è quello di identificare i polimorfismi genomici in base al fatto che questi alterano il sito di taglio di un enzima di restrizione. Questa modificazione della restrizione del DNA può essere facilmente evidenziata mediante elettroforesi del DNA.

L'identificazione del genotipo virale può essere condotta anche mediante sequenziamento a partire dall'amplificato della reazione di polimerizzazione.

19. Espressione dei risultati

A completamento delle analisi svolte, riportare il risultato ottenuto come Enterovirus: Assente o Presente per volume analizzato (metodo qualitativo) o PFP per volume analizzato (metodo quantitativo).

Bibliografia

1. Cova L, Kopecka H, Aymard M. Use of cRNA probes for the detection of enteroviruses by molecular hybridization. *J Med Virol* 1988;24:11-8.
2. Divizia M, De Filippis P, Di Napoli A, Gabrieli A, Santi L, Panà A. HAV recovery from tap water evaluation of different types of membranes. *Ann Ig* 1989;1:57-64.
3. Divizia M, Ruscio V, Degener AM, Panà A. Hepatitis A virus identification in wastewater by PCR and hybridization. *Microbiologica* 1998;21:161-7.
4. Divizia M, Santi AL, Panà A. Ultrafiltration an efficient second step for hepatitis A virus and poliovirus concentration. *J Virol Methods* 1998;23:55-62.
5. Marin MG. *Diagnostica di laboratorio. Tecniche di amplificazione genica dal laboratorio alla pratica clinica*. Milano: Edizioni Sorbona; 1999.
6. Morace G, Pisani G, Divizia M. Detection of hepatitis A virus in concentrated river water by polymerase chain reaction. *Zbl Hyg* 1993;193:521-7.
7. Payment P, Trudel M. *Manuel de techniques virologiques*. Québec: Universités francophones du Québec; 1989.
8. Saiki RK, Scharf S, Faloona F. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
9. Schwartzbrod L. *Virologie des milieux hydriques*. Paris: Tec & Doc-Lavoisier; 1991.
10. Sobsey MD, Glass JS. Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Appl Environ Microbiol* 1980;40:201-5.

DETERMINAZIONE DEI FUNGHI

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Funghi rilevato con i metodi ISS A [016A rev. 00; 016B rev. 00; 016C rev. 00].

I funghi o miceti sono organismi eucarioti, chemiosintetici ed eterotrofi, unicellulari o più spesso organizzati in strutture pluricellulari, che possono raggiungere dimensioni notevoli (da 20 a 50 volte superiori a quelle delle cellule batteriche). Possiedono una parete cellulare rigida composta da chitina e si riproducono con formazione di spore (riproduzione sessuata) e di tallospore e conidiospore (riproduzione asessuata).

La classificazione dei funghi è basata soprattutto sul particolare ciclo vitale, sulla morfologia delle strutture riproduttive e sul tipo di spore prodotte.

In base alla morfologia delle cellule si distinguono: miceti filamentosi o muffe, pluricellulari, il cui sviluppo avviene per mezzo di ife con produzione di micelio; funghi dimorfi, i quali possono acquisire l'aspetto di muffa o di lievito in base a specifiche caratteristiche ambientali e lieviti, unicellulari, che si riproducono per gemmazione. In quest'ultimo caso, in alcune specie i blastoconidi si staccano dalla cellula madre, mentre in altre rimangono attaccati gli uni agli altri a formare lo pseudomicelio.

I funghi sono largamente diffusi in natura, ubiquitari in tutte le matrici ambientali. Il metabolismo eterotrofo li costringe ad un tipo di vita dipendente da un ospite e, a seconda che il rapporto sia di tipo neutro, di danno o di vantaggio per l'organismo ospite, vengono rispettivamente suddivisi in saprofiti, parassiti e simbionti. In particolare, i saprofiti sono responsabili della degradazione della sostanza organica e possono vivere negli strati superficiali del suolo e negli ambienti acquatici (fiumi, laghi, mari, acque sotterranee, acque contaminate da liquami). Inoltre, possono essere rilevati nelle acque confezionate e nelle acque potabili in rete dove possono far parte della flora microbica costituente i biofilm. Sono particolarmente resistenti ai trattamenti di potabilizzazione e di disinfezione delle acque e possono anche essere ritrovati in acque di piscina contenenti alte concentrazioni di cloro.

Alcune specie fungine sono in grado di produrre effetti tossigeni per ingestione di alimenti contaminati; altre specie possono provocare micosi cutanee e delle mucose. Diversi generi, per trasmissione aerea, possono dar luogo a specifiche patologie allergiche, più frequentemente associate a reazioni di ipersensibilità (riniti allergiche, asma bronchiale, alveoliti allergiche).

La maggior parte dei funghi isolati nelle acque appartiene alla classe dei Deuteromiceti (Funghi Imperfetti). Le loro concentrazioni nelle acque sono molto variabili e possono presentare ampie oscillazioni (valori da 0 ad alcune centinaia/mL) in relazione alle caratteristiche dell'acqua.

Il parametro è da considerarsi un indice di qualità dell'acqua erogata e di eventuali fenomeni di ricrescita in rete; la sua determinazione nelle acque potabili e negli impianti di distribuzione può essere utile per verificare l'efficienza del trattamento di potabilizzazione.

Nel DL.vo n. 31 del 2001 e successive modifiche e integrazioni, al paragrafo Avvertenza dell'Allegato I, è prevista la determinazione qualitativa del parametro (Presenza/Assenza).

Tuttavia, i metodi di seguito riportati forniscono risultati quantitativi da riferire al volume di 100 mL, così come stabilito dal DL.vo n. 27 del 2002.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS A [016A rev. 00; 016B rev. 00; 016C rev. 00] vengono utilizzate per la determinazione dei funghi nelle acque da destinare e destinate al consumo umano, eventualmente nelle acque di piscina, nelle acque trattate e nel dialisato standard quando trattasi di acque e soluzioni di dialisi.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo - ISS A 016A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di funghi che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione a (22 ± 25) °C per (3 ± 5) giorni, contare le colonie sviluppate.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Oltre la normale attrezzatura di laboratorio (Appendice) è necessario disporre di membrane di esteri di cellulosa di colore preferibilmente nero.

2.1.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare è pari a 100 mL e comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Czapek Dox Agar

Composizione		
Saccarosio	30	g
Nitrato di sodio	2	g
Fosfato bipotassico	1	g
Solfato di magnesio	0,5	g
Cloruro di potassio	0,5	g
Solfato ferroso	0,01	g
Agar	15	g
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 la completa soluzione degli ingredienti. Sterilizzare a (121 ± 3) °C per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Tutte le operazioni devono essere effettuate sotto cappa a flusso laminare. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, a (5 ± 3) °C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.1.4.2. Soluzione di blu lattofenolo

Colorante per microscopia disponibile in commercio.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Filtrazione su membrana

Filtrare 100 mL di campione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, preferibilmente nera e 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). Trasferire sterilmente la membrana in una capsula di Petri contenente il terreno Czapek Dox Agar (2.1.4.1.), evitando la formazione di bolle d'aria tra la membrana e la superficie del terreno agarizzato. Incubare alla temperatura di (22 ± 25) °C in frigo-termostato per (3 ± 5) giorni.

2.1.5.2. Conferma

Il riconoscimento delle specie fungine è complesso e richiede tempi lunghi, oltre a una comprovata esperienza sulla materia. Infatti, l'aspetto delle colonie varia a seconda del substrato, naturale o artificiale, sul quale si sviluppano e in relazione a diversi fattori.

Nel caso si voglia procedere all'identificazione tassonomica si rimanda ai testi specifici, ma è consigliabile inviare il campione a un centro specializzato per il riconoscimento delle specie.

Qualora, comunque, si volesse procedere all'osservazione microscopica degli organismi cresciuti, effettuare isolamenti delle colonie da saggiare.

Per i lieviti è consigliabile re-isolare le colonie su Sabouraud Dextrose Agar (2.1.4.2.). Con un'ansa sterile prelevare al centro della colonia da saggiare e strisciare su un vetrino portaoggetti stemperando in una goccia di acqua distillata sterile. Osservare al microscopio, preferibilmente a contrasto di fase con ingrandimento 20x o 40x, per evidenziare lo pseudomicelio e le spore; eventualmente procedere all'identificazione con prove biochimiche miniaturizzate disponibili in commercio.

Volendo procedere all'osservazione microscopica dei funghi filamentosi, usare la tecnica dell'osservazione diretta. Fare aderire delicatamente una striscia di nastro adesivo trasparente alla superficie della colonia da esaminare; trasferire il nastro, con la parte adesiva rivolta verso il basso, su un vetrino portaoggetti sul quale è stata già posta una goccia di soluzione di blu di lattofenolo (2.1.4.2.) e coprire con un vetrino coprioggetti; osservare all'ingrandimento 100x per distinguere eventuali corpi fruttiferi.

2.1.6. Interpretazione dei risultati

Sul terreno di crescita (2.1.4.1.) la struttura filamentosa del micelio vegetativo degli ifomiceti può essere nascosta da una copertura piumosa, cotonosa o polverulenta formata da miceli aerei e da spore, qualche volta disposte ad anelli concentrici. Diversamente, i lieviti sviluppano colonie dall'aspetto cremoso, a cupola, generalmente bianche nella prima fase di crescita e, dopo la formazione di blastoconidi, di colorazioni diverse.

Dopo incubazione contare tutte le colonie caratteristiche.

2.1.7. Espressione dei risultati

Il numero di funghi si calcola in base al numero di colonie contate sul terreno di crescita, considerando l'eventuale diluizione effettuata, e riportando il valore come numero per 100 mL di campione ($N \cdot 100$ mL).

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:

$$C = \frac{N \times V_s \times F}{V_t}$$

dove

C	numero di colonie per 100 mL
N	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
V_t	volume di campione analizzato
V_s	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
F	fattore di diluizione

2.2. Metodo - ISS A 016B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di funghi che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione a $(22 \pm 25) ^\circ\text{C}$ per (3 ± 5) giorni, contare le colonie sviluppate.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Oltre la normale attrezzatura di laboratorio (Appendice) è necessario disporre di membrane di esteri di cellulosa di colore preferibilmente nero.

2.2.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare è pari a 100 mL e comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.2.4. Terreni di coltura e reagenti

2.2.4.1. Sabouraud Dextrose Agar

Composizione	
Peptone micologico	10 g
Destrosio	40 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH $5,6 \pm 0,2$	

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 per la completa soluzione degli ingredienti. Dopo aver sciolto la polvere, sterilizzare a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per 15 min. Dopo la sterilizzazione, si consiglia di modificare il pH del terreno ancora in fase liquida con una soluzione di acido lattico sterile al 10% (2.2.4.2.), in modo da ottenere un valore di pH $4,5 \pm 0,2$. L'abbassamento del pH favorisce la riduzione della crescita batterica, la cui preponderanza potrebbe disturbare la crescita fungina.

Distribuire in capsule di Petri, lasciare solidificare. Tutte le operazioni devono essere eseguite sotto cappa a flusso laminare. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Per garantire una maggiore selettività del metodo, è possibile aggiungere al terreno l'antibiotico cloramfenicolo, secondo le specifiche operative.

2.2.4.2. Soluzione di acido lattico al 10%

Composizione	
Acido lattico	10 mL
Acqua distillata	90 mL

Mettere in un pallone tarato 10 mL di acido lattico e portare a 100 mL con acqua distillata. Sono reperibili in commercio soluzioni a titolo noto.

2.2.4.3. Soluzione di blu lattofenolo

Colorante per microscopia disponibile in commercio.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Filtrazione su membrana

Filtrare 100 mL di campione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, preferibilmente nera e 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). Trasferire sterilmente la membrana in una capsula di Petri contenente il terreno Sabouraud Dextrose Agar (2.2.4.1.), evitando la formazione di bolle d'aria tra la membrana e la superficie del terreno agarizzato. Incubare alla temperatura di (22 ÷ 25) °C in frigo termostato per (3 ÷ 5) giorni.

2.1.5.2. Conferma

Il riconoscimento delle specie fungine è complesso e richiede tempi lunghi, oltre a una comprovata esperienza sulla materia. Infatti, l'aspetto delle colonie varia a seconda del substrato, naturale o artificiale, sul quale si sviluppano e in relazione a diversi fattori.

Nel caso si voglia procedere all'identificazione tassonomica si rimanda ai testi specifici, ma è consigliabile inviare il campione a un centro specializzato per il riconoscimento delle specie.

Qualora, comunque, si volesse procedere all'osservazione microscopica degli organismi cresciuti, effettuare isolamenti delle colonie da saggiare.

Per i lieviti prelevare al centro della colonia da saggiare e strisciare su un vetrino portaoggetti stemperando in una goccia di acqua distillata sterile. Osservare al microscopio, preferibilmente a contrasto di fase con ingrandimento 20x o 40x, per evidenziare lo pseudomicelio e le spore; eventualmente procedere all'identificazione con prove biochimiche miniaturizzate disponibili in commercio. Volendo procedere all'osservazione microscopica dei funghi filamentosi, usare la tecnica dell'osservazione diretta. Fare aderire delicatamente una striscia di nastro adesivo trasparente alla superficie della colonia da esaminare; trasferire il nastro, con la parte adesiva rivolta verso il basso, su un vetrino portaoggetti sul quale è stata già posta una goccia di soluzione di blu di lattofenolo (2.2.4.3.) e coprire con un vetrino coprioggetti; osservare all'ingrandimento 100x per distinguere eventuali corpi fruttiferi.

2.2.6. Interpretazione dei risultati

Sul terreno di crescita (2.2.4.1.) la struttura filamentosa del micelio vegetativo degli ifomiceti può essere nascosta da una copertura piumosa, cotonosa o polverulenta formata da miceli aerei e da spore, qualche volta disposte ad anelli concentrici. Diversamente, i lieviti sviluppano colonie dall'aspetto cremoso, a cupola, generalmente bianche nella prima fase di crescita e, dopo la formazione di blastoconidi, di colorazioni diverse.

Dopo incubazione contare tutte le colonie caratteristiche.

2.2.7. Espressione dei risultati

Il numero di funghi si calcola in base al numero di colonie contate sul terreno di crescita, considerando l'eventuale diluizione effettuata, e riportando il valore come numero per 100 mL di campione (N. /100 mL).

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:

$$C = \frac{N \times V_s \times F}{V_t}$$

dove

<i>C</i>	numero di colonie per 100 mL
<i>N</i>	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
<i>V_t</i>	volume di campione analizzato
<i>V_s</i>	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
<i>F</i>	fattore di diluizione

2.3. Metodo - ISS A 016C rev. 00

2.3.1. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di funghi che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione a $(22 \pm 25)^\circ\text{C}$ per (3 ± 5) giorni, contare le colonie sviluppate.

2.3.2. Strumentazione e vetreria

Oltre la normale attrezzatura di laboratorio (Appendice) è necessario disporre di membrane di esteri di cellulosa di colore preferibilmente nero.

2.3.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare è pari a 100 mL e comunque funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

2.3.4. Terreni di coltura e reagenti

2.3.4.1. Agar all'estratto di malto

Composizione	
Estratto di malto	30 g
Agar	1 g
Acqua distillata	1000 mL
pH $5,4 \pm 0,2$	

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 per la completa soluzione degli ingredienti. Sterilizzare in autoclave alla temperatura di $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Tutte le operazioni devono essere effettuate sotto cappa a flusso laminare. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.3.4.2. Soluzione di blu lattofenolo

Colorante per microscopia disponibile in commercio.

2.3.5. Procedura

2.3.5.1. Filtrazione su membrana

Filtrare 100 mL di campione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, preferibilmente nera e 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 $0,7/0,2 \mu\text{m}$). Trasferire sterilmente la membrana in una capsula di Petri contenente il terreno Agar all'estratto di malto (2.3.4.1.), evitando la formazione di bolle d'aria tra la membrana e la superficie del terreno agarizzato. Incubare alla temperatura di $(22 \pm 25)^\circ\text{C}$ in frigo termostato per (3 ± 5) giorni.

2.3.5.2. Conferma

Il riconoscimento delle specie fungine è complesso e richiede tempi lunghi, oltre a una comprovata esperienza sulla materia. Infatti, l'aspetto delle colonie varia a seconda del substrato, naturale o artificiale, sul quale si sviluppano e in relazione a diversi fattori.

Nel caso si voglia procedere all'identificazione tassonomica si rimanda ai testi specifici, ma è consigliabile inviare il campione a un centro specializzato per il riconoscimento delle specie.

Qualora, comunque, si volesse procedere all'osservazione microscopica degli organismi cresciuti, effettuare isolamenti delle colonie da saggiare.

Per i lieviti prelevare al centro della colonia da saggiare e strisciare su un vetrino portaoggetti stemperando in una goccia di acqua distillata sterile. Osservare al microscopio, preferibilmente a contrasto di fase con ingrandimento 20x o 40x, per evidenziare lo pseudomicelio e le spore; eventualmente procedere all'identificazione con prove biochimiche miniaturizzate disponibili in commercio.

Volendo procedere all'osservazione microscopica dei funghi filamentosi, usare la tecnica dell'osservazione diretta. Fare aderire delicatamente una striscia di nastro adesivo trasparente alla superficie della colonia da esaminare; trasferire il nastro, con la parte adesiva rivolta verso il basso, su un vetrino portaoggetti sul quale è stata già posta una goccia di soluzione di blu di lattofenolo (2.3.4.2.) e coprire con un vetrino coprioggetti; osservare all'ingrandimento 100x per distinguere eventuali corpi fruttiferi.

2.3.6. Interpretazione dei risultati

Sul terreno di crescita (2.3.4.1.) la struttura filamentosa del micelio vegetativo degli ifomiceti può essere nascosta da una copertura piumosa, cotonosa o polverulenta formata da miceli aerei e da spore, qualche volta disposte ad anelli concentrici. Diversamente, i lieviti sviluppano colonie dall'aspetto cremoso, a cupola, generalmente bianche nella prima fase di crescita e, dopo la formazione di blastoconidi, di colorazioni diverse.

Dopo incubazione contare tutte le colonie caratteristiche.

2.3.7. Espressione dei risultati

Il numero di funghi si calcola in base al numero di colonie contate sul terreno di crescita, considerando l'eventuale diluizione effettuata, e riportando il valore come numero per 100 mL di campione ($N \cdot 100$ mL).

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:

$$C = \frac{N \times V_s \times F}{V_t}$$

dove

C	numero di colonie per 100 mL
N	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
V_t	volume di campione analizzato
V_s	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
F	fattore di diluizione

Bibliografia

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th, ed. Washington, DC: APHA; 2005.
2. Barron GL. *Genera of Hyphomycetes from soil*. New York: Lubrecht L. and Cramer B.J. Ltd; 1977.
3. La Placa M. *Caratteri generali dei miceti in principi di microbiologia medica*. Bologna: Esculapio Editrice; 1991.
4. Orsi A. Generalità sui miceti. In: Pasquinelli F. *Diagnostica e tecniche di Rosini*. Editrice Firenze; 1989. Vol. II p. 461-507.

DETERMINAZIONE DI CISTI DI *GIARDIA* E OOCISTI DI *CRYPTOSPORIDIUM*

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro cisti di *Giardia* e oocisti di *Cryptosporidium* rilevati con i metodi ISS A [017A rev. 00; 017B rev. 00; 017C rev. 00; 017D rev. 00]. Nella nota 2 dell'Allegato I (parte C) del DL.vo n. 31 del 2 Febbraio 2001 è stabilito che qualora campioni di acqua che provengano o siano influenzati da acque superficiali risultino positivi per la presenza di *Clostridium perfringens* (spore compresse) l'autorità sanitaria debba verificare che non sussistano potenziali pericoli dovuti alla presenza di microrganismi patogeni quali, ad esempio, *Cryptosporidium*. Nel successivo DL.vo n. 27 del 2 Febbraio 2002 che apporta modifiche e integrazioni al D. Lgs. n. 31 viene fissato che nell'espressione dei risultati si debba fare riferimento ad un volume di 100 L relativamente alla ricerca dei Protozoi.

Di seguito verranno descritti i metodi per la ricerca di cisti e oocisti di protozoi patogeni, *Giardia* e *Cryptosporidium*, rispettivamente. La rilevanza, legata alla determinazione di protozoi parassiti nelle acque, nasce dalla considerazione che, negli anni più recenti, alcuni protozoi, ritenuti inizialmente agenti di zoonosi, acquistando capacità infettanti più ampie, sono stati anche riconosciuti come patogeni umani diretti e che l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha inserito, tra i patogeni emergenti di interesse prioritario, i protozoi patogeni *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Giardia lamblia (o *intestinalis*) è un protozoo flagellato, riconosciuto come patogeno per l'uomo dalla metà degli anni '60. Ha un ciclo monoxeno che comprende lo stadio di trofozoite e quello di cisti. Gli organismi appartenenti al genere *Cryptosporidium* sono protozo coccidi e *C. parvum* è riconosciuto come patogeno per l'uomo dal 1976. Tuttavia, altre specie appartenenti al genere, negli ultimi anni, si sono manifestate come patogeni umani. Anche *Cryptosporidium* ha un ciclo monoxeno, nel quale la riproduzione sessuata e asessuata si compiono nello stesso ospite; attraverso una serie di stadi si produce l'oociste, forma di resistenza nell'ambiente e infettiva nell'uomo e negli animali.

Le cisti di *Giardia* e le oocisti di *Cryptosporidium* sono gli stadi infettanti e vengono introdotte nell'ambiente con le feci dai serbatoi di infezione che possono essere rappresentati dall'uomo, ma anche da numerosi animali sia selvatici, sia di allevamento, sia domestici. La diffusione delle cisti e delle oocisti nell'ambiente è favorita dalla scarsa specificità d'ospite di questi parassiti, nonché dalla notevole resistenza di queste strutture agli stress ambientali.

Giardiasi e criptosporidiosi sono patologie a trasmissione fecale-orale, che possono trascorrere in forma asintomatica o determinare una gastroenterite autorisolvente nei soggetti immunocompetenti. Negli immunodepressi, in modo particolare nei malati di AIDS, invece, soprattutto l'infezione da *Cryptosporidium*, può cronicizzare, provocando una diarrea persistente, con conseguenze gravi, che possono arrivare sino alla morte.

Le modalità d'infezione, per entrambi i parassiti, sono rappresentate dal consumo di acqua o di alimenti contaminati, dal contatto interpersonale e con animali che fungono da serbatoi. Tuttavia, l'acqua è stata riconosciuta come il principale veicolo di trasmissione per questi parassiti, la cui presenza è stata rilevata sia nelle acque grezze, soprattutto di origine superficiale, sia nelle acque potabilizzate. Infatti, le acque superficiali possono subire facilmente una contaminazione attraverso gli scarichi di reflui civili o di allevamenti, il dilavamento del terreno e la fertirrigazione. È nota, d'altra parte, la resistenza delle cisti e delle oocisti agli stress ambientali e ai trattamenti chimico-fisici comunemente attuati nei processi di potabilizzazione che non riescono quindi a garantire la rimozione dei parassiti da acque contaminate.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS A [017A rev. 00; 017B rev. 00; 017C rev. 00; 017D rev. 00] vengono utilizzate per la determinazione di *Giardia* e *Cryptosporidium* nelle acque da destinare e destinate al consumo umano ed eventualmente nelle acque di piscina.

Possono essere utilizzate per valutare la eventuale presenza e distribuzione di protozoi nelle riserve idriche, per individuare la sorgente di contaminazione e per analizzare l'efficienza del trattamento di potabilizzazione.

Di seguito vengono descritti metodi idonei alla ricerca di cisti e oocisti in acque destinate al consumo umano che contengano basse concentrazioni di solidi sospesi che consentono di quantificare, se presenti, il numero di protozoi.

Sono anche descritte alcune tecniche molecolari (PCR, RT-PCR).

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo - ISS A 017A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Il metodo fa riferimento alla norma ISO/CD15553.

Prevede la filtrazione su capsula, porosità nominale 1 µm, di campioni d'acqua, l'eluizione delle cisti e oocisti con una soluzione di lavaggio, la concentrazione e la purificazione dell'eluato tramite centrifugazione e flottazione/immunoseparazione, la determinazione e il conteggio al microscopio delle cisti e oocisti mediante immunofluorescenza diretta.

Inoltre, prove di conferma molecolare possono essere effettuate mediante reazioni di PCR e *nested* PCR (2.3.), mentre informazioni sullo stato di vitalità possono essere acquisite mediante la reazione di RT-PCR (2.4.).

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio (Appendice), è necessario disporre di:

- agitatore con braccetti;
- agitatore ruotante Sample Mixer MX-1 (Dynal);
- apparato di filtrazione per filtri a membrana da 25 mm di diametro;
- camera umida;
- centrifuga refrigerata (intorno a +4 °C) a rotore basculante per contenitori da 50-250 mL;
- contalitri;
- contenitori da centrifuga da 250 mL con fondo conico o tipo bottiglia;
- contenitori da centrifuga monouso da 50 e 15 mL con fondo conico;
- dispositivo magnetico MPC-1 per provetta L10 con parete piatta (Dynal);
- dispositivo magnetico MPC-S per provette da 1,5 mL (Dynal);
- filtro a capsula in polietersulfone, (1 µm di porosità, 6 cm di diametro, 21 cm di lunghezza, 1300 cm² di superficie) per volumi di acqua inferiori ai 50 litri di acqua grezza; filtro a capsula in poliestere (1 µm di porosità, 6 cm di diametro, 21 cm di lunghezza, 1300 cm² di superficie) per volumi di acqua superiori ai 50 litri di acqua grezza o fino a 1000 litri di acqua potabile;
- membrane di policarbonato, 1,2 µm di porosità, 25 mm di diametro;
- microscopio ad epifluorescenza con filtri per l'FITC (filtri di eccitazione 450-490 nm, filtro barriera 515-520 nm) e per gli UV (filtro di eccitazione 340-380 nm, filtro barriera 420 nm), obiettivi 20, 40 e 100x e oculare con micrometro lineare. È necessario disporre del contrasto di fase e qualora possibile del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;

- pipette da 1, 10, 25 mL;
- pipettrici automatiche;
- pompa aspirante con portata intorno ai 14 L/min;
- provette L10 con parete piatta (Dynal);
- regolatore di flusso;
- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette;
- vetrini a pozzetto (compresi nel kit per l'immunofluorescenza);
- vetrini a pozzetto Spot-on (Dynal);
- vortex.

2.1.3. Volume da campionare

Questo metodo consente di campionare volumi variabili d'acqua (10-1000 L) in relazione alla torbidità, usando eventualmente tipologie diverse di cartucce (polietersulfone oppure poliestere) oppure aumentandone il numero per filtrare il volume appropriato. Nel caso in cui l'acqua sia clorata aggiungere tiosolfato di sodio (2.1.4.1.) (250 mL di tiosolfato di sodio al 2% ogni 100 L di campione).

2.1.4. Reagenti

2.1.4.1. Soluzione di tiosolfato di sodio al 2%

Composizione	
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2 g
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere la polvere in 100 mL di acqua distillata. Sterilizzare in autoclave per 15 min a (121 ± 3) °C.

2.1.4.2. Soluzione di PBS (Phosphate Buffer Saline) 10x

Composizione	
NaCl	80 g
KH_2PO_4	2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	29 g
KCl	2 g
Acqua distillata	

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Aggiustare il pH a $(7,2 \pm 0,2)$ con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N. Sterilizzare in autoclave per 15 min a (121 ± 3) °C. La soluzione è anche disponibile in commercio pronta per l'uso.

2.1.4.3. Soluzione di PBS 1x

Composizione	
PBS 10x	100 mL
Acqua distillata	900 mL

Mescolare i due componenti.

2.1.4.4. Soluzione di Idrossido di sodio (NaOH) 0,1 N

Composizione	
NaOH	0,4 g
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere su agitatore magnetico.

2.1.4.5. Soluzione di Acido cloridrico (HCl) 0,1 N

Composizione	
HCl 37%	0,82 mL
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere con acqua distillata.

2.1.4.6. Tampone per eluizione

Composizione	
Laureth 12	1 g
Tris-HCl 1M, pH 7,4	10 mL
EDTANa ₂ 0,5 M, pH 8	2 mL
Antischiuma A	150 µL
Acqua distillata	

Pesare il Laureth 12 in un beaker di vetro pirex e aggiungere 100 mL di acqua distillata. Scaldare su una piastra o in un forno a microonde per consentire al Laureth 12 di sciogliersi. Trasferire la soluzione in un matraccio da 1 L.

Sciacquare il beaker numerose volte e mettere l'acqua di risciacquo nel matraccio. Aggiungere gli altri reattivi. Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

2.1.4.7. Tris-HCl 1 M, pH 7,4

Composizione	
Tris	121,1 g
Acqua distillata	

Sciogliere il Tris nell'acqua e portare a pH ($7,4 \pm 0,2$) con HCl o NaOH 0,1 N.

Portare a volume finale di 1L con acqua distillata.

Sterilizzare con un filtro a membrana da 0,22 µm; conservare in un contenitore di plastica a temperatura ambiente.

2.1.4.8. EDTANa₂ 0,5 M, pH 8

Composizione	
EDTANa ₂ 2 H ₂ O	186,1 g
Acqua distillata	

Sciogliere l'EDTANa₂ nell'acqua e portare a pH ($8 \pm 0,2$) con HCl o NaOH 0,1 N. Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

Soluzione di Percoll-Saccarosio 1 (100 mL)

Composizione	
Percoll (densità=1,13)	45 mL
Saccarosio 2,5 M	10 mL
Acqua distillata	45 mL

Mescolare i componenti e controllare che la densità sia tra 1,09-1,1 con un idrometro.

Tutta la procedura deve essere svolta mantenendo i reattivi a (5 ± 3) °C.

2.1.4.10. Soluzione di Percoll-Saccarosio 2 (30 mL)

Composizione	
Percoll (densità=1,13)	15,9 mL
Saccarosio 2,5 M	14,1 mL

Mescolare i componenti e controllare che la densità sia tra 1,09-1,1 con un idrometro. Tutta la procedura deve essere svolta mantenendo i reattivi a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

2.1.4.11. Soluzione di Saccarosio 2,5 M

Composizione	
Saccarosio	855,8 g
Acqua distillata	400 mL

Far sciogliere il saccarosio nell'acqua distillata preriscaldata. Raffreddare e portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

Soluzione di lavaggio A

Composizione	
PBS 10x	100 mL
Tween-80	1 mL
Sodio Dodecil Solfato (SDS)	1 g
Antischiuma B	500 μL
Acqua distillata	

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

Soluzione di lavaggio B

Composizione	
PBS 10x	100 mL
Tween-20	0,5 mL
Acqua distillata	

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

2.1.4.14. Kit per immunoseparazione (Dyna)

Componenti
Soluzione di microsferi (dynabeads) coniugate con anticorpi anti- <i>Cryptosporidium</i> ;
Soluzione di microsferi (dynabeads) coniugate con anticorpi anti- <i>Giardia</i> ;
Tampone A 10x SL™;
Tampone B 10x SL™.

Conservare i componenti a $(0\div 8) ^\circ\text{C}$.

2.1.4.15. Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta

Componenti
Anticorpi monoclonali anti- <i>Cryptosporidium</i> coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina;
Anticorpi monoclonali anti- <i>Giardia</i> coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina;
Controllo positivo;
Controllo negativo;
Tampone di lavaggio;
Soluzione di montaggio (Mounting Medium).

Conservare i componenti a (0÷8) °C, protetti dalla luce.

Soluzione stock DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole)

Composizione	
DAPI	2 mg
Metanolo	1 mL

Poiché la soluzione si conserva al buio a (0÷8) °C per due settimane, è opportuno preparare il volume minimo di soluzione necessario per l'uso.

Soluzione di colorazione DAPI - PBS (0,4 µg DAPI/mL PBS)

Composizione	
soluzione stock DAPI	10 µL
PBS 1x	50 mL

La soluzione deve essere preparata giornalmente e mantenuta al buio a a (0÷8) °C. La concentrazione della soluzione può essere incrementata fino ad 1 µg/mL se si osserva un decremento della colorazione.

Tampone di pre - trattamento

Composizione	
Sodio polifosfato	5 g
Acqua distillata	1000 mL

Dissolvere la polvere di polifosfato nell'acqua distillata. La soluzione si conserva a (5 ± 3) °C o a (20 ± 5) °C per una settimana e si utilizza a (20 ± 5) °C.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Campionamento

Il campionamento può essere effettuato ponendo la pompa e il regolatore di flusso a monte della capsula e il contalitri a valle di questa; si può anche utilizzare un sistema in pressione (rubinetto). Il flusso deve essere intorno a 2 L/min. Prima di iniziare il campionamento e montare quindi la capsula, è importante far passare attraverso il sistema dai 100 ai 200 L di acqua. Inserire poi la capsula dopo aver rimosso e tenuto da parte i tappi che proteggono le due estremità della capsula. Dopo aver avviato la pompa aprire la valvola di sfiato della capsula girandola in senso orario, permettendo così all'aria di uscire dalla capsula. Effettuare il campionamento.

Quando tutto il campione è stato raccolto rimuovere l'entrata del tubo dalla fonte d'acqua e consentire alla pompa di pompare il resto dell'acqua rimasta nel tubo dentro la capsula. Staccare il tubo di uscita e tappare l'estremità di uscita della capsula, quindi staccare l'altra estremità facendo attenzione a non perdere l'acqua rimasta nella capsula e tapparla. In ogni caso, il campionamento deve considerarsi concluso quando il flusso viene ridotto in conseguenza dell'intasamento della capsula. Trasportare la capsula in condizioni refrigerate in laboratorio.

2.1.5.2. Eluizione della capsula

Se l'acqua rimasta nella capsula riempie meno della metà della cartuccia, mantenerla nella cartuccia e procedere con l'eluizione. Se l'acqua rimasta nella capsula riempie più della metà della cartuccia, svuotarla in un contenitore e tenerla da parte come parte del campione.

Per la capsula in polietersulfone, aggiungere 120 mL di tampone per eluizione (2.1.4.6.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 12 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 cpm (cicli per minuto). Tenendo la cartuccia in posizione

verticale, rimuovere il tappino dall'estremità inferiore e raccogliere il liquido di pre-lavaggio in un tubo da centrifuga.

Aggiungere altri 120 mL di tampone per eluizione (2.1.4.6.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 9 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 cpm. Raccogliere l'eluato in un tubo da centrifuga come sopra indicato.

Miscelare l'eluato con il precedente e aggiungere l'eventuale residuo d'acqua tenuto da parte.

Centrifugare a 1100 x g per 10 minuti, decelerare lentamente senza usare il freno. Eliminare con delicatezza il surnatante. Misurare il volume del campione concentrato.

Per la capsula in poliestere, aggiungere 120 mL di tampone di pre-trattamento (2.1.4.18.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 12 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 cpm. Tenendo la cartuccia in posizione verticale, rimuovere il tappino dall'estremità inferiore e raccogliere il liquido di pre-lavaggio in un tubo da centrifuga. Chiudere l'estremità inferiore della capsula; riempire la capsula con 120 mL di acqua distillata sterile attraverso l'estremità di entrata, chiuderla e ruotarla delicatamente per trenta secondi. Raccogliere l'eluato in un tubo da centrifuga come sopra indicato.

Aggiungere 120 mL di tampone per eluizione (2.1.4.6.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 12 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 cpm. Tenendo la cartuccia in posizione verticale, rimuovere il tappino dall'estremità inferiore e raccogliere il liquido di pre-lavaggio in un tubo da centrifuga.

Aggiungere altri 120 mL di tampone per eluizione (2.1.4.6.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 4 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 cpm. Senza rimuovere la capsula dall'agitatore, ruotarla in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 8 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 cpm. Raccogliere l'eluato in un tubo da centrifuga come sopra indicato.

Miscelare gli eluati ottenuti dai vari lavaggi e aggiungere l'eventuale residuo d'acqua tenuto da parte.

Centrifugare a 1100 x g per 10 minuti, decelerare lentamente senza usare il freno. Eliminare con delicatezza il surnatante. Misurare il volume del campione concentrato.

Qualora il procedimento di concentrazione avesse portato ad un campione finale di eccessiva torbidità per l'analisi diretta mediante immunofluorescenza, si procede alla chiarificazione del campione (2.1.5.3.).

2.1.5.3. Chiarificazione

– Chiarificazione mediante flottazione su cuscino di Percoll-Saccarosio

Preparare 30 mL di soluzione Percoll-Saccarosio per ogni campione. Questa soluzione può essere preparata secondo due metodi diversi.

Utilizzare la soluzione di Percoll-Saccarosio 1 (2.1.4.9.) e procedere nel seguente modo.

Prendere 0,5 mL di campione concentrato (dal volume totale di 1-50 mL) e aggiungere 19,5 mL di soluzione di lavaggio A (2.1.4.12.) utilizzata per eluire la cartuccia. Mettere, in una provetta da 50 mL, 20 mL di campione e iniettare sul fondo 30 mL di soluzione di Percoll-Saccarosio 1, facendo attenzione a non rompere l'interfaccia tra le due componenti.

Utilizzare la soluzione di Percoll-Saccarosio 2 (2.1.4.10.) e procedere nel seguente modo.

Prendere 1 mL di campione concentrato dal volume finale (1-50 mL) e aggiungere 19 mL di soluzione di lavaggio A (2.1.4.12.) utilizzata inizialmente per eluire la cartuccia. Mettere la soluzione di Percoll-Saccarosio 2 (30 mL) in una provetta da 50 mL e stratificare sulla superficie 20 mL di campione.

In entrambi i casi centrifugare a 1050 x g per 10 min a (5 ± 3) °C accelerando lentamente e senza usare il freno alla fine della centrifugazione.

Prelevare con cura il supernatante, l'interfaccia e circa 5 mL di Percoll-Saccarosio (per un totale di circa 25 mL) e raccoglierlo in una provetta da 50 mL.

Introdurre nella provetta contenente il campione chiarificato la soluzione di lavaggio B (2.1.4.13.) fino a raggiungere il volume di 50 mL, mescolare con vortex e centrifugare a 1050 x g per 15 min.

Aspirare il supernatante e raccogliere il pellet (1-5 mL).

È opportuno includere tra i campioni da sottoporre a purificazione alcuni controlli positivi a concentrazione nota di cisti e oocisti, che, processati contemporaneamente, consentono una più precisa valutazione di efficienza di recupero del metodo.

– *Chiarificazione mediante separazione immunomagnetica*

La metodica prevede che le cisti di *Giardia* e le oocisti di *Cryptosporidium* siano isolate da campioni concentrati di acqua mediante l'utilizzo di microsferi uniformi, monodisperse, superparamagnetiche, coniugate covalentemente con anticorpi anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* (2.1.4.14.). I complessi microsferi-cisti/oocisti vengono separati mediante l'applicazione di un campo magnetico; le cisti/oocisti vengono successivamente dissociate dalle microsferi così da ottenere un volume ridotto di una sospensione finale limpida da analizzare mediante immunofluorescenza diretta.

L'efficienza di recupero di cisti e oocisti varia dal 60 al 95% se, relativamente al particolato presente nell'acqua, sono rispettati i limiti indicati. È inoltre opportuno includere tra i campioni da sottoporre a purificazione alcuni controlli positivi a concentrazione nota di cisti e oocisti, che, processati contemporaneamente, consentono una più precisa valutazione di efficienza di recupero del metodo.

La quantità di materiale particolato presente in 10 mL di campione concentrato deve essere inferiore a 0,5 mL, altrimenti il campione deve essere diluito e diviso in più aliquote prima di procedere alla chiarificazione.

Trasferire 10 mL di campione in un'apposita provetta con parete piatta e aggiungere 1 mL di tampone A 10x SL™ (2.1.4.14.), 1 mL di tampone B 10x SL™ (2.1.4.14.), 100 µL della sospensione di microsferi anti-*Cryptosporidium* (2.1.4.14.) e 100 µL della sospensione di microsferi anti-*Giardia* (2.1.4.14.) (le sospensioni di microsferi devono essere agitate vigorosamente mediante vortex immediatamente prima di essere usate). Incubare il campione in agitazione-rotazione nell'agitatore ruotante Sample Mixer MX-1 a 18 rpm, a temperatura ambiente per un'ora. Inserire la provetta nel dispositivo MPC-1 con la parete piatta rivolta verso il magnete e ruotare il dispositivo manualmente e delicatamente in modo da effettuare una rotazione di 90° ogni secondo per la durata di due minuti. Durante questa fase i complessi microsferi-cisti e oocisti aderiscono alla parete della provetta esposta al magnete. Senza rimuovere la provetta dal dispositivo, eliminare il supernatante capovolgendo il dispositivo stesso. Togliere la provetta dal dispositivo magnetico e risospingere il campione in 1 mL di tampone A 1x. Trasferire la soluzione in una provetta da 1,5 mL e inserire quest'ultima nell'apposito dispositivo MPC-S con la parete magnetica inserita. Agitare manualmente il campione ruotando il dispositivo in modo da compiere un movimento di 90° al secondo per la durata di un minuto. Aspirare immediatamente il supernatante, facendo attenzione a non rimuovere anche i complessi microsferi cisti/oocisti. Rimuovere la barra magnetica e risospingere il campione in 100 µL di HCl 0,1 N; agitare per 5 secondi mediante vortex e lasciare riposare a temperatura ambiente per 10 minuti nel portaprovette MPC-M (senza parete magnetica). Dopo ulteriore agitazione mediante vortex per 5 secondi, reinserire i campioni nel portaprovette MPC-M, reintrodurre la parete magnetica nel dispositivo stesso e attendere 10 secondi. Senza togliere la provetta dal dispositivo magnetico, prelevare 50 µL di supernatante e trasferli su un vetrino a pozzetto Dynal Spot-on su cui sono stati posti 5 µL di NaOH 1 N. Il vetrino è lasciato all'aria ad asciugare e, una volta asciutto, il campione è fissato depositando nel pozzetto 50 µL di metanolo e lasciando evaporare all'aria. Si procede quindi alla identificazione per immunofluorescenza diretta (2.1.5.4.).

Trasferire i rimanenti 50 µL in una provetta da 1,5 mL e aggiungere 5 µL di NaOH 1 N. Questa aliquota di campione potrà essere utilizzata qualora si ritenga opportuno procedere a

prove di conferma molecolare mediante PCR, oppure potrà essere analizzata per immunofluorescenza in un secondo tempo.

2.1.5.4. Determinazione mediante immunofluorescenza diretta

Principio: si usano anticorpi monoclonali di topo anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* coniugati con FITC, che si legano ad antigeni presenti sulle pareti.

Procedimento su vetrino a pozzetto

Portare i reattivi del kit (2.1.4.15.) a temperatura ambiente. Trasferire 10-50 μL di campione in un pozzetto. Trasferire 10 μL del controllo positivo in un pozzetto e 10 μL del controllo negativo in un altro. Asciugare a temperatura ambiente o più rapidamente in stufa a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Fissare ciascun campione secondo le modalità indicate dalla ditta produttrice del kit. Mettere 20-50 μL di anticorpo su ciascun pozzetto e incubare il vetrino in camera umida, al buio, a temperatura ambiente per 30 minuti. Aspirare l'eccesso di anticorpo con una pompa Venturi usando una pipetta con punta molto fine. Lavare il vetrino con molta cautela usando il tampone di lavaggio fornito dal kit o PBS 1x. Porre 100 μL della soluzione di colorazione DAPI-PBS (2.1.4.17.) nel pozzetto e lasciare incubare a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ al buio per 15 minuti. Eseguire altri due lavaggi con PBS 1x (2.1.4.3.) e acqua distillata. Asciugare il vetrino a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Montare il vetrino coprioggetto con una goccia di soluzione di montaggio, facendo attenzione a non formare bolle.

– Procedimento su filtro

Portare tutti i reattivi del kit (2.1.4.15.) a temperatura ambiente. Preparare la membrana (porosità 1,2 μm , in policarbonato, di diametro 25 mm) bagnandola con PBS 1x; porre la membrana sul supporto di filtrazione. Filtrare 1 mL di campione. Evitare che il campione posto sulla membrana vada a secco durante tutti i passaggi.

Aggiungere una goccia di anticorpi fluoresceinati. Incubare a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per 30 min. Filtrare, quindi lavare una volta la membrana con PBS 1x (2.1.4.3.) aggiungendone 3 mL e filtrando. Successivamente porre 100 μL della soluzione di colorazione del DAPI (2.1.4.17.) e lasciare incubare a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Effettuare altri 2 lavaggi con PBS 1x (2.1.4.3.). Eliminare ogni traccia di liquido mediante filtrazione.

Porre una goccia di liquido di montaggio su un vetrino, farvi aderire la membrana, quindi montare il vetrino coprioggetto con il liquido di montaggio.

2.1.5.5. Esame microscopico

Osservare al microscopio tutto il vetrino a 200 o 400 ingrandimenti con il microscopio ad epifluorescenza e individuare le strutture fluorescenti verde mela con forma e dimensioni caratteristiche delle cisti di *Giardia* (lunghezza 8 - 12 μm e larghezza 7 - 10 μm) e oocisti di *Cryptosporidium* (diametro 3,5 - 6,5 μm), utilizzando un micrometro lineare ed effettuando dei confronti con un controllo positivo. Segnare le coordinate del vetrino dove sono state rinvenute le cisti e le oocisti. Questa valutazione consente di fornire una determinazione presuntiva delle cisti e oocisti.

Effettuare l'osservazione delle stesse strutture in epifluorescenza a 1000 ingrandimenti in immersione, quindi passare sull'obiettivo con il contrasto di fase o con il contrasto ad interferenza differenziale (DIC). Con il contrasto di fase è possibile distinguere le cisti e oocisti piene da quelle vuote e, quindi, dare un'ulteriore indicazione sulla presunta vitalità delle cisti e oocisti piene. Con il microscopio a contrasto interferenziale è invece possibile valutare la presenza di strutture interne (nuclei, corpi mediani, spazio peritrofico nella *Giardia*; sporozoit e granuli residui nel *Cryptosporidium*), valutazioni che consentono sia di confermare la determinazione, sia di dare una ulteriore indicazione in merito alla condizione delle cisti e oocisti: si possono distinguere, infatti, cisti e oocisti vuote, contenenti strutture amorfe oppure contenenti strutture caratteristiche ben conservate.

Effettuata questa valutazione, registrare il conteggio totale di cisti di *Giardia* e di oocisti di *Cryptosporidium*.

Se è stata effettuata anche la valutazione con il contrasto di fase annotare il numero di cisti e oocisti che risultano piene o vuote.

Se è stata effettuata anche la valutazione con il DIC annotare il numero di cisti e oocisti vuote, con contenuto amorfo o con strutture interne.

Per effettuare le valutazioni al contrasto di fase o con il DIC è consigliabile utilizzare la tecnica di immunofluorescenza su vetrino a pozzetto perché questa condizione consente una maggiore trasparenza.

Per effettuare la valutazione di vitalità mediante la colorazione con il DAPI è consigliabile effettuare la lettura con l'obiettivo 100 × e l'apposito filtro ad UV. Vengono considerate vitali le cisti e le oocisti contenenti nuclei colorati in blu.

2.1.5.6. Interpretazione dei risultati

Ogni campione che presenta una o più strutture tipiche assimilabili a cisti di *Giardia* o oocisti di *Cryptosporidium* per fluorescenza, forma e dimensioni può essere considerato presuntivamente un campione positivo.

La torbidità, il particolato organico e inorganico del campione d'acqua possono interferire con il recupero delle cisti e oocisti nella fase di concentrazione e purificazione e con la determinazione delle strutture al microscopio.

Organismi (alghe e lieviti) e detriti autofluorescenti possono interferire durante la determinazione al microscopio a epifluorescenza e causare la registrazione di falsi positivi.

Le sostanze utilizzate nella disinfezione possono determinare delle interferenze nella individuazione delle strutture interne alle cisti e oocisti perché possono causarne la parziale distruzione o trasformazione in strutture amorfe e pertanto irricognoscibili.

2.1.5.7. Espressione dei risultati

Il numero di cisti e oocisti contate sull'intera superficie di ciascun pozzetto si riferisce al volume di campione ivi deposto. Tale numero deve essere rapportato al volume totale di supernatante derivante dalla chiarificazione e al volume di eluato sottoposto a chiarificazione; tale numero viene quindi rapportato al volume totale del campione eluato e infine rapportato al numero di litri di campione filtrati. Riportare comunque il risultato come n./100L

2.1.6. Efficienza di recupero del metodo

Se si utilizzano capsule filtranti in polietersulfone, l'efficienza di recupero del metodo prima della fase di chiarificazione varia dal 20 al 35% per *Cryptosporidium* e dal 45 al 95% per *Giardia*. Se si utilizzano capsule filtranti in poliestere, l'efficienza di recupero del metodo per *Cryptosporidium* varia dal 33 al 79%, prima della fase di chiarificazione.

2.2. Metodo - ISS A 017B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Il metodo fa riferimento alla norma ISO/CD15553.

Si basa sulla filtrazione di volumi noti di acqua, attraverso filtri costituiti da dischi di schiuma compressa, sulla eluizione dei dischi stessi mediante ripetuti movimenti di compressione e decompressione in un tampone eluente e sulla concentrazione dell'eluato mediante aspirazione con pompa da vuoto. Il concentrato è successivamente sottoposto a chiarificazione mediante flottazione su cuscino di saccarosio o mediante immunoseparazione. Il rilevamento delle cisti di *Giardia* e delle oocisti di *Cryptosporidium* avviene per analisi microscopica del campione mediante immunofluorescenza diretta.

Inoltre, prove di conferma molecolare possono essere effettuate mediante reazioni di PCR e *nested* PCR (2.3.), mentre informazioni sullo stato di vitalità possono essere acquisite mediante la reazione di RT-PCR (2.4.).

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio (Appendice), è necessario disporre di:

- Filta-Max Automatic Wash Station (IDEXX) completa di equipaggiamento (alloggiamento per il filtro, macchina, stantuffo, tubo di eluizione, tubo di concentrazione, base del tubo di concentrazione, coperchio con barra magnetica, chiave di Allen, tubo di acciaio, tappini di gomma, bustine di nylon, guarnizioni O-ring);
- moduli filtranti Filta- Max (dischi di schiuma compressa, IDEXX), porosità nominale 1 µm;
- membrane di nitrato di cellulosa, 73mm di diametro, 3 µm di porosità (IDEXX);
- piastra magnetica;
- pinzette;
- pompa da vuoto manuale.

2.2.3. Volume da campionare

I volumi di acqua da campionare mediante filtrazione sono variabili in relazione alla loro origine e alla loro torbidità. Il metodo consente di filtrare fino a 1000 litri di acqua potabile e 50 litri di acqua reflua e grezza superficiale, concentrando il campione ad un volume finale di circa 25 mL.

2.2.4. Reagenti

Soluzione di Phosphatase Buffer Saline - Tween 20 10x (PBST 10x)

Composizione	
NaCl	80 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	29 g
KCl	2 g
Tween 20	100 µL
Acqua distillata	

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Aggiustare il pH a 7,2±0,2 con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N. Sterilizzare in autoclave per 15 min a (121 ± 3) °C.

2.2.4.2. Soluzione di Phosphatase Buffer Saline - Tween 20 1x (PBST 1X)

Composizione	
Soluz. di PBS - Tween 20 10x	100 mL
Acqua distillata	

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Sterilizzare in autoclave per 15 min a (121 ± 3) °C.

2.2.4.3. Soluzione di Percoll-Saccarosio 1 (100 mL) (2.1.4.9.)

2.2.4.4. Soluzione di Percoll-Saccarosio 2 (30 mL) (2.1.4.10.)

2.2.4.5. Soluzione di Saccarosio 2,5 M (2.1.4.11.)

2.2.4.6. Soluzione di lavaggio A (2.1.4.12.)

2.2.4.7. Soluzione di lavaggio B (2.1.4.13.)

2.2.4.8. Kit per immunoseparazione (Dynal) (2.1.4.14.)

2.2.4.9. Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta (2.1.4.15.)

2.2.4.10. Soluzione stock DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) (2.1.4.16.)**2.2.4.11. Soluzione di colorazione DAPI-PBS (0,4 µg DAPI/mL PBS) (2.1.4.17)****2.2.5. Procedura****2.2.5.1. Campionamento e volume da analizzare**

Posizionare il modulo filtrante Filta-Max nel suo alloggiamento di filtrazione con la vite rivolta verso il coperchio. Avvitare il coperchio. Collegare l'estremità di entrata dell'alloggiamento di filtrazione all'estremità di uscita della pompa in modo che il flusso sia rivolto dal coperchio all'estremità opposta dell'alloggiamento. Collegare l'estremità di uscita di quest'ultimo al contalitri. È richiesta una pressione di circa 5 bar per produrre il massimo flusso consentito pari a 3-4/L al minuto e, in ogni caso la pressione non deve mai eccedere il valore di 8 bar. Una volta completata la procedura di filtrazione, tappare le estremità dell'alloggiamento di filtrazione con gli appositi tappini e trasportare in laboratorio in condizioni refrigerate.

2.2.5.2. Eluizione del filtro*- Primo lavaggio*

Rimuovere il modulo filtrante dalla camera di alloggiamento, conservare l'acqua residua eventualmente contenuta come parte del campione e procedere al risciacquo della camera stessa; unire l'acqua di risciacquo a quella residua.

Porre una membrana di 73 mm di diametro e 3 µm di porosità sulla base del tubo di concentrazione con il lato rugoso rivolto all'insù. Avvitare il tubo di concentrazione alla sua base e versarvi l'eventuale campione residuo e il liquido di risciacquo della camera di alloggiamento.

Applicare del silicone lubrificante sulla guarnizione O-ring posta all'esterno dello stantuffo (plunger) nel dispositivo Wash Station. Accendere la Wash Station. Premere F1 per posizionare lo stantuffo nella posizione di partenza. Avvitare il modulo filtrante all'estremità dello stantuffo mediante l'apposita vite. Far scorrere il tubo di eluizione attorno allo stantuffo e fissarne la base alle apposite ganasce sulla Wash Station.

Premere il tasto F1 per abbassare lo stantuffo. Inserire la chiave di Allen nel foro posto sotto la base del tubo di eluizione e rimuovere la vite dal modulo filtrante. Avvitare il tubo di acciaio (senza il tappino di gomma) alla base del tubo di eluizione. Versare 600 mL di PBST 1x (2.2.4.2.) nel tubo di concentrazione assemblato alla sua base e posizionarlo al di sotto del tubo di eluizione utilizzando l'apposita ganascia. Premere il tasto F1 per il prelavaggio. Premere il tasto F3 per il primo lavaggio (lo stantuffo effettua 20 movimenti verticali di compressione e decompressione del filtro). Staccare il tubo di concentrazione assemblato alla sua base dalle ganasce e tenerlo con le mani al di sotto del tubo di acciaio per consentire la procedura di scolo (spurgo). Premere il tasto F4 per la procedura di scolo. Chiudere l'estremità del tubo di acciaio con il tappino di gomma.

- Prima fase di concentrazione

Chiudere il tubo di concentrazione assemblato alla sua base con il coperchio dotato di barra magnetica e posizionarlo su una piastra magnetica. Connettere il tubo di concentrazione ad una pompa da vuoto manuale per ridurre la fase liquida e ad una bottiglia di plastica usata come trappola. Aprire il rubinetto alla base del tubo di concentrazione e azionare la pompa evitando di superare una pressione di 30 mm di Hg. Aspirare il liquido evitando che la membrana vada a secco. Le cisti e le oocisti dovrebbero rimanere sospese nel liquido al di sopra della membrana la cui funzione è quella di consentire la riduzione del volume d'acqua. Staccare la pompa, rimuovere il coperchio con la barra magnetica e sciacquare la barra con acqua distillata, scolandola nel tubo di concentrazione. Travasare il liquido concentrato in una provetta da 50 mL. Sciacquare il tubo di concentrazione con acqua distillata e aggiungerla nella provetta. Con l'ausilio di pinzette, togliere la membrana dalla base del tubo di concentrazione e conservarla nell'apposita bustina di nylon.

Qualora per l'elevata torbidità del campione, non fosse possibile concentrare il liquido mediante utilizzo di una sola membrana, procedere alla sostituzione di questa con altre membrane conservando ciascuna in una bustina (nel caso specifico le membrane possono essere posizionate nella base del tubo di concentrazione con il lato liscio all'insù).

- *Secondo lavaggio*

Togliere il tappino dall'estremità del tubo di acciaio, versare 600 mL di PBST 1x (2.2.4.2.) nel tubo di concentrazione e posizionare questo al di sotto del tubo di eluizione utilizzando l'apposita ganascia.

Premere il tasto F3 per il secondo lavaggio (lo stantuffo effettua 10 movimenti verticali di compressione e decompressione del filtro). Staccare il tubo di concentrazione assemblato alla sua base dalle ganasce e tenerlo con le mani al di sotto del tubo di acciaio per consentire la procedura di scolo (spurgo). Premere il tasto F4 per la procedura di scolo. Chiudere l'estremità del tubo di acciaio con il tappino di gomma. Aggiungere il campione concentrato derivante dal primo lavaggio ai 600 mL di eluato provenienti dal secondo.

- *Seconda fase di concentrazione*

Chiudere nuovamente il tubo di concentrazione assemblato alla sua base con il coperchio dotato di barra magnetica, posizionarlo sulla piastra magnetica e sottoporre ad agitazione. Connettere il tubo di concentrazione alla pompa da vuoto e alla bottiglia di plastica usata come trappola e procedere come descritto sopra per la prima fase di concentrazione. Non rimuovere completamente tutto il liquido ma arrestare il processo di concentrazione quando il livello del liquido nel tubo di concentrazione è tale che il magnete sia per metà ancora immerso nel liquido stesso.

Staccare la pompa, rimuovere il coperchio con la barra magnetica e sciacquare la barra con acqua distillata, scolandola nel tubo di concentrazione. Travasare il liquido concentrato in una provetta da 50 mL. Sciacquare il tubo di concentrazione con acqua distillata e aggiungerla nella provetta. Con l'ausilio di pinzette, togliere la membrana dalla base del tubo di concentrazione e conservarla in una bustina di nylon.

Aggiungere 5 mL di PBST 1x (2.2.4.2.) in una delle bustine contenenti le membrane e, mantenendola chiusa, strofinare la superficie facendola scorrere tra le dita per circa un minuto. Con una pipetta rimuovere il liquido e aggiungerlo nella provetta contenente il campione concentrato. Trasferire le altre membrane, una alla volta, nella bustina in cui era contenuta la prima e procedere alla loro eluizione con le stesse modalità. Complessivamente il volume del liquido concentrato dovrebbe essere pari a circa 20-30 mL. Procedere con la fase di chiarificazione (2.1.5.3.).

2.2.6. Chiarificazione (2.1.5.3.)

2.2.7. Determinazione mediante immunofluorescenza diretta (2.1.5.4.)

2.2.8. Esame microscopico (2.1.5.5.)

2.2.9. Interpretazione dei risultati (2.1.5.6.)

2.2.10. Espressione dei risultati (2.1.5.7.)

2.2.11. Efficienza di recupero del metodo

L'efficienza di recupero del metodo prima della fase di chiarificazione varia dal 60 al 90% per entrambi i parassiti.

2.3. Metodo per PCR e *nested* PCR - ISS A 017C rev. 00

2.3.1. Principio del metodo

Viene verificata la presenza di DNA specifico per *Cryptosporidium parvum* e *Giardia* spp. estraendo il DNA e amplificando mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) con primers specifici. Per *Cryptosporidium parvum* è possibile aumentare la sensibilità del metodo effettuando una ulteriore

PCR (*Nested PCR*) in cui vengono utilizzati primers in grado di appaiarsi all'interno della sequenza amplificata, aumentando in tal modo il segnale ottenuto nel gel di agarosio.

2.3.2. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio (Appendice), è necessario disporre di:

- apparecchio per corsa elettroforetica
- bagno maria termostato
- generatore di corrente
- termociclatore
- transilluminatore
- vaschetta per gel

2.3.3. Reagenti

2.3.3.1. Tampone di lisi (100 mL)

Composizione		
NaCl 1 M	12	mL
Tris-HCl 1M	2,5	mL
EDTANa ₂ 100 mM, pH 8	10	mL
SDS 10%	10	mL
Acqua distillata		

Portare la soluzione composta da NaCl, Tris-HCl e EDTANa₂ ad un volume di 90 mL con acqua distillata e autoclavare a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Lasciare raffreddare e aggiungere l'SDS.

2.3.3.2. NaCl 1 M (250 mL)

Composizione	
NaCl	14,61 g
Acqua distillata	

Sciogliere il sale nell'acqua distillata e portare al volume finale di 250 mL.

2.3.3.3. Tris-HCl 1 M (250 mL)

Composizione	
Tris	30,29 mL
Acqua distillata	

Sciogliere il Tris in 200 mL di acqua distillata e portare a pH (7 ± 0,2) con HCl 0,1N. Portare a volume finale di 250 mL con acqua distillata.

2.3.3.4. EDTANa₂ 100 mM, pH 8 (250 mL)

Composizione	
EDTANa ₂ ·2H ₂ O	9,3 g
Acqua distillata	

Sciogliere l'EDTA in 200 mL di acqua distillata e portare a pH (8 ± 0,2) con NaOH 0,1 N. Portare a volume finale di 250 mL con acqua distillata.

2.3.3.5. Soluzione SDS 10% (100 mL)

Composizione	
SDS	10 g
Acqua distillata	

Sciogliere l'SDS in 90 mL di acqua distillata e scaldare a (60 ± 1) °C fino a completo scioglimento. Attendere fino a quando la soluzione non torna a temperatura ambiente, poi verificare che il pH sia $(7,2 \pm 0,2)$. Portare a volume finale di 100 mL con acqua distillata.

2.3.3.6. Soluzione stock di proteinasi K

Composizione	
Proteinasi K	
Acqua distillata	

Risospendere l'enzima liofilizzato in un volume noto di acqua distillata a concentrazione di 5000 µg/500 µL e lasciare tutta la notte la soluzione a (0 ± 8) °C.

2.3.3.7. Kit per estrazione del DNA (Qiagen)

Composizione	
Colonne di purificazione del DNA;	
Tampone di preparazione;	
Tampone di lavaggio;	
Tampone di eluizione.	

Conservare a -20 °C.

2.3.3.8. Kit per PCR

Composizione	
Soluzione di MgCl ₂ ;	
Tampone di PCR;	
Oligonucleotidi (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);	
Polimerasi.	

Conservare a -20 °C.

2.3.3.9. Primers per PCR

Primers per <i>Cryptosporidium</i> :	
CHSP1: 5'-AGCAATCCTCTGCCGTACAGG-3'	
CHSP4: 5'-AGAGCATCCTTGATCTTCT-3'	
Primers per <i>Giardia</i> :	
GGL: 5'-AAGTGCCTCAACGAGCAGCT-3'	
GGR: 5'-TTAGTGCTTTGTGACCATCGA-3'	

Risospendere i primers liofilizzati in acqua deionizzata sterile in modo tale da ottenere una soluzione 100 µM. Agitare la soluzione mediante vortex per qualche minuto e tenere a (5 ± 3) °C tutta la notte. La concentrazione dei primers può essere verificata allo spettrofotometro. La lettura viene eseguita a 260 nm. Conservare a -20 °C.

2.3.3.10. Primers per Nested-PCR

Primers per <i>Cryptosporidium parvum</i>:	
CPHSP2511:	5'-ATGACCAAGCTTATTGAAC-3'
CPHSP2769:	5'-GTGATCTTGCTGCTCTTACCA-3'

Risospendere i primers liofilizzati in acqua deionizzata sterile in modo tale da ottenere una soluzione 100 μ M. Agitare la soluzione mediante vortex per qualche minuto e tenere a (5 ± 3) °C tutta la notte. La concentrazione dei primers può essere verificata allo spettrofotometro. La lettura viene eseguita a 260 nm. Conservare a -20°C .

2.3.3.11. Soluzione stock di Bromuro di etidio

Composizione	
Bromuro di etidio	100 mg
Acqua distillata	10 mL

Sciogliere su agitatore magnetico il bromuro di etidio in polvere in acqua deionizzata sterile. Trasferire la soluzione così ottenuta in provette da 1,5 mL e conservare al buio a (5 ± 3) °C.

2.3.3.12. Gel di agarosio 2% (100 mL)

Composizione	
Agarosio	2 g
TAE 1x	100 mL
Bromuro di etidio	5 μ L

Sciogliere l'agarosio nel TAE 1x (2.3.3.14.) scaldando leggermente fino a completa dissoluzione della polvere. Aggiungere il bromuro di etidio e mescolare. Versare la soluzione nello stampo per il gel, posizionare lo spaziatore e attendere fino a completa solidificazione. Togliere lo spaziatore e porre il gel nella vaschetta per corsa elettroforetica riempita con TAE 1x (2.3.3.14.). Effettuare la corsa a 70 V per 1 ora. Osservare il gel al transilluminatore.

2.3.3.13. Soluzione TAE 50x (100mL)

Composizione	
Tris	24,2 g
EDTANa ₂ 0,5 M, pH 8	10 mL
Acido acetico glaciale	5,7 mL
Acqua distillata	

Sciogliere il Tris in 60 mL di acqua distillata, aggiungere EDTANa₂ e acido acetico glaciale. Portare a volume finale di 100 mL con acqua distillata, filtrare e sterilizzare a (121 ± 3) °C per 15 min.

2.3.3.14. Soluzione di TAE 1 x

Composizione	
TAE 50x	20 mL
Acqua distillata	980 mL

Mescolare i due componenti.

2.3.3.15. EDTA Na₂ 0,5 M, pH 8 (400 mL)

Composizione	
EDTANa ₂ 2H ₂ O	74,4 g
Acqua distillata	

Sciogliere l'EDTANa₂ in 300 mL di acqua distillata e portare a pH (8 ± 0,2) con HCl o NaOH 0,1 N. Portare a volume finale di 400 mL con acqua distillata.

2.3.3.16. Tampone di caricamento (Orange G)

Composizione	
Orange G	20 mg
Glicerolo	5 mL
Acqua distillata	10 mL

Mescolare i componenti.

2.3.3.17. Pesi molecolari 100-1000 pb

2.3.4. Procedura per PCR

2.3.4.1. Estrazione del DNA

Centrifugare il campione (50µL derivanti dalla reazione di chiarificazione per immunoseparazione) a 13000 rpm per 20 minuti ed eliminare il supernatante. Risospendere il pellet (non sempre visibile) in 94 µL del tampone di lisi (2.3.3.1.). Effettuare 15 cicli di congelamento in azoto liquido della durata di 5 minuti e di scongelamento a 65 °C in bagno maria fino a completo scioglimento del ghiaccio. Aggiungere 6 µL della soluzione di proteinasi K (2.3.3.6.) e incubare tutta la notte a (37 ± 1) °C in bagno maria, in agitazione. Aggiungere al campione il tampone di preparazione presente nel Kit per estrazione del DNA (2.3.3.7.) e porlo nella colonna di purificazione (2.3.3.7.) precedentemente alloggiata in una provetta da 2 mL. Centrifugare a 10000 x g per 30-60 secondi. Scartare la componente liquida presente nella provetta. Lavare la colonna di purificazione con il tampone di lavaggio fornito nel kit (2.3.3.7.) e centrifugare nuovamente per 30-60 secondi. Scartare la componente liquida e centrifugare nuovamente per 30-60 secondi alla massima velocità. Porre la colonna di purificazione in una nuova provetta da 1,5 mL e aggiungere 50 µL del tampone di eluizione fornito nel kit (2.3.3.7.). Centrifugare la colonna di purificazione per 1 minuto a 10000 x g e conservare la componente acquosa (circa 50 µL).

2.3.4.2. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Il DNA estratto viene utilizzato per una PCR con una coppia di primers specifici. Preparare per ogni campione una soluzione (50 µL) 2,5mM di MgCl₂ in PCR buffer 1x, 0,5 µM di ogni primer (2.3.3.9.), 200 µM di dNTP, contenente 2,5 U/100 µL di Taq Polimerasi e 15 µL del DNA estratto; portare la soluzione a volume finale di 50µL con acqua distillata sterile. Eseguire la PCR per *Cryptosporidium* attivando la polimerasi a 95 °C per 10 min; proseguire con 40 cicli a 95 °C per 20s, a 60 °C per 45s e a 72 °C per 45 s, con un passaggio di estensione a 72 °C per 5 min. Eseguire la PCR per *Giardia* attivando la polimerasi a 95 °C per 10 min; proseguire con 40 cicli a 95 °C per 20s, a 55 °C per 45s e a 72 °C per 45s, con un passaggio di estensione a 72 °C per 5 min. Miscelare i prodotti della PCR (16 µL per campione) con 4 µL del tampone di caricamento (2.3.3.16.). Introdurre la miscela nei pozzetti del gel ed effettuare la corsa su gel di agarosio (2%) (2.3.3.12.).

2.3.4.3. Interpretazione dei risultati

Nella corsa elettroforetica, per considerare il risultato positivo è necessario rilevare la presenza di una banda corrispondente a 590 pb per *Cryptosporidium parvum* e a 163 pb per *Giardia* spp. La presenza di un amplificato atteso non fornisce indicazioni sul numero di cisti e oocisti presenti ma permette di rilevare la presenza fino a 60 cisti e 120 oocisti.

2.3.5. Procedura per Nested PCR

2.3.5.1. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Il DNA ottenuto nella precedente PCR viene nuovamente amplificato con una coppia di primers specifici (2.3.3.10.).

Per ogni campione preparare una soluzione (50 µL) 2,5 mM di MgCl₂, in PCR buffer 1×, 0,5 µM di ogni primer (2.3.3.10.), 200 µM di dNTP, contenente 2,5 U/100 µL di Polimerasi e 15 µL del prodotto di PCR; portare la soluzione a volume finale di 50 µL con acqua distillata sterile. Eseguire la PCR per *Cryptosporidium* attivando la polimerasi a 95 °C per 10 min; proseguire con 40 cicli a 95 °C per 20 s, a 60 °C per 45 s e a 72 °C per 45 s, con uno step di estensione a 72 °C per 5 min. Miscelare i prodotti della PCR (16 µL per campione) con 4 µL del tampone di caricamento (2.3.3.16.). Introdurre la miscela nei pozzetti del gel ed effettuare la corsa su gel di agarosio (2%) (2.3.3.12.).

2.3.5.2. Interpretazione dei risultati

Nella corsa elettroforetica, per considerare positivo il risultato è necessario rilevare la presenza di una banda a 280 pb per *Cryptosporidium parvum*. La presenza di un amplificato atteso non fornisce indicazioni sul numero di oocisti presenti ma permette di rilevare la presenza fino a 12 oocisti.

2.4. Metodo per RT-PCR - ISS A 017D rev. 00

2.4.1. Principio del metodo

Viene verificata la capacità delle cisti di *Giardia* spp. e delle oocisti di *Cryptosporidium parvum* di produrre un mRNA specifico indice della vitalità delle cisti e delle oocisti. Ciò viene effettuato mediante estrazione aspecifica dell'mRNA e successiva RT-PCR con primers specifici.

2.4.2. Strumentazione e vetreria (2.3.2.)

2.4.3. Reagenti

Kit per estrazione dell' mRNA

Composizione	
Sferette paramagnetiche coniugate con oligo(dT) ₂₅ ;	
Tampone di lisi;	
Tamponi di lavaggio 1 e 2.	

Conservare a (0÷8) °C.

Soluzione di DEPC -Acqua

Composizione	
DEPC	0,1 g
Acqua distillata	100 mL

Porre il contenitore da utilizzare per preparare la soluzione a 180 °C in stufa per almeno 4 ore, con l'ancoretta magnetica e l'apposito tappo.

Mettere l'acqua distillata e il DEPC nel contenitore; mantenere la soluzione in agitazione per tutta la notte mediante agitatore magnetico. Sterilizzare la soluzione in autoclave a (121 ± 3) °C per 20 minuti.

Utilizzare la soluzione a temperatura ambiente.

2.4.3.3. Kit per RT-PCR

Composizione

Soluzione di MgCl₂;
Tampone di PCR;
Oligo(dT)₁₆;
Oligonucleotidi (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);
Inibitori delle RNase;
Reverse Transcriptasi;
Polimerasi.

Conservare a -20 °C.

2.4.3.4. Matrice Ultrapura (Bio-Rad)

Prima dell'uso porre la matrice su agitatore magnetico a velocità moderata per mantenerla in sospensione.

2.4.4. Procedura

2.4.4.1. Estrazione dell'mRNA

Centrifugare la provetta da 1,5 mL contenente le cisti e le oocisti vitali (50 µL della soluzione derivante dalla reazione di chiarificazione per IMS) a 5000 x g per 5 minuti. Eliminare il supernatante. Aggiungere al pellet ottenuto dalla centrifugazione 200 µL di una matrice ultrapura (2.4.3.4.).

Incubare la provetta a (45 ± 1) °C per 45 minuti. Nelle fasi successive è necessario lavorare in ghiaccio. Aggiungere successivamente 200 µL del tampone di lisi contenuto nel kit di estrazione dell'mRNA (2.4.3.1.).

Sottoporre la soluzione a 5 cicli di congelamento in azoto liquido e scongelamento in un bagno maria a (37 ± 1) °C.

Dopo aver centrifugato la provetta a 12000 x g per 5 min alla temperatura di (4 ± 1) °C, prelevare il supernatante contenente l'mRNA e porlo in una provetta da 1,5 mL.

Agitare manualmente i flaconcini contenenti le sfere paramagnetiche coniugate con Oligo(dT)₂₅ (2.4.3.1.). Prelevare 20 µL di sfere per ogni campione e porli in una provetta da 1,5 mL. Alloggiare la provetta nel dispositivo magnetico (2.1.2.) ed eliminare il supernatante; effettuare un lavaggio con il tampone di lisi contenuto nel kit di estrazione dell'mRNA (2.4.3.1.).

Risospingere le sfere in 20 µL di tampone di lisi (2.4.3.1.) e aggiungerle al campione. Agitare manualmente per qualche minuto.

Alloggiare la provetta nel dispositivo magnetico e agitare manualmente per 3-5 minuti compiendo un movimento di circa 90 °C ogni secondo. Eliminare il supernatante.

Effettuare un lavaggio con 300 µL del tampone di lavaggio 1 e due lavaggi con tampone di lavaggio 2 entrambi contenuti nel kit di estrazione dell'mRNA (2.4.3.1.).

L'mRNA legato alle sfere può essere direttamente aggiunto alla miscela per la reazione di RT-PCR (2.4.4.2.).

2.4.4.2. Reazione di RT-PCR

L'mRNA legato alle sfere viene utilizzato per una reazione di trascrizione inversa in vitro. Utilizzando i reattivi contenuti nel kit per RT-PCR (2.4.3.3.) preparare per ogni campione una soluzione (25 µL) 5 mM di MgCl₂ in PCR buffer 1x, 1 mM di ogni nucleotide, 1,7 µM di oligo

(dT)₁₆, contenente 20U\100 µL di inibitori delle Rnase, 50U\100 µL di Reverse Transcriptasi e 5 µL del mRNA estratto; portare la soluzione a volume finale di 25 µL con DEPC-H₂O (2.4.3.2.). Scaldare il campione a (42 ± 1) °C per 30 minuti, poi a 95 °C per 5 min e conservare a (5 ± 3) °C. Il cDNA ottenuto dalla reazione di RT-PCR viene utilizzato per una PCR con una coppia di primers specifici (2.3.3.9.).

Preparare per ogni campione una soluzione (50 µL) 2,5 mM di MgCl₂ in PCR buffer 1x, 0,5 µM di ogni primer (2.3.3.9.), contenente 1,5 U\100µL di Polimerasi e 10 µL del cDNA; portare al volume finale di 50 µL con acqua distillata sterile.

Eseguire la PCR per *Cryptosporidium* attivando la polimerasi a 95 °C per 10 min; proseguire con 40 cicli a 95 °C per 20 s, a 60 °C per 45 s e a 72 °C per 45 s, con uno step di estensione a 72 °C per 5 min.

Eseguire la PCR per *Giardia* attivando la polimerasi a 95 °C per 10 min; proseguire con 40 cicli a 95 °C per 20 s, a 55 °C per 45 s e a 72 °C per 45 s, con uno step di estensione a 72 °C per 5 min.

Miscelare i prodotti della PCR (16 µL per campione) con 4 µL del tampone di caricamento (2.3.3.16.). Introdurre la miscela nei pozzetti del gel ed effettuare la corsa su gel di agarosio (2%) (2.3.3.12.).

2.4.4.3. Interpretazione dei risultati

Nella corsa elettroforetica per considerare positivo il risultato è necessario rilevare la presenza di una banda corrispondente a 590 pb per *Cryptosporidium parvum* e a 163 pb per *Giardia* spp. La presenza di un amplificato atteso non fornisce indicazioni sul numero di cisti e oocisti presenti, ma permette di rilevare la presenza fino a 10 cisti e 10 oocisti.

Bibliografia

1. EPA/821-R-01-025. *Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/IMS/FA*. Washington, DC: USEPA, Office of Water; 2001.
2. EPA/821-R-99-001. *Method 1622: Cryptosporidium in Water by Filtration/IMS/FA and viability by DAPI/PI*. Washington, DC: USEPA, Office of Water; 1999.
3. Hsu BM, Huang C. Performance of the immunomagnetic separation method for *Cryptosporidium* in water under various operation conditions. *Biotechn Prog* 2001;17(6):1114-8.
4. ISO/CD 15553. *Water quality – Isolation and identification of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts*. Geneva: International Organization for Standardization; 2002.
5. Sartory DP, Parton A, Parton AC, Roberts J, Bergmann K. Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from small and large volume water samples using a compressed foam filter system. *Lett Appl Microb* 1998;27:316-22.

DETERMINAZIONE DEGLI STAFILOCOCCCHI PATOGENI

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Stafilococchi patogeni rilevato con i metodi ISS A [018A rev. 00; 018B rev. 00].

I microrganismi compresi nel genere *Staphylococcus* sono di forma sferica (0,5-1 µm di diametro), Gram-positivi, immobili, generalmente privi di capsula, asporigeni, anaerobi facoltativi, generalmente catalasi positivi, chemorganotrofi e alcune sono specie cromogene. In colture in brodo possono presentarsi isolati, doppi, in tetradi e sono in grado di dividersi in modo caratteristico, secondo più piani formando ammassi irregolari e a grappolo. La maggior parte dei ceppi è in grado di crescere in presenza di NaCl al 10% e ad una temperatura compresa tra i 18 °C e i 40 °C. Possono produrre esotossine, quali tossine α, β, γ, δ, leucocidina, tossina epidermolitica ed enterotossine, ed esoenzimi come iarulonidasi, stafilocinasi, enzimi lipolitici e coagulasi.

Le popolazioni naturali di tali organismi sono associate soprattutto alla pelle, alle ghiandole della pelle e alle mucose degli animali a sangue caldo e dell'uomo. Possono inoltre essere presenti in una ampia varietà di prodotti animali come carne, latte e formaggio e a fonti ambientali quali suolo, sabbie, polvere, aria e acque naturali. Alcune specie sono saprofiti, altre commensali, e altre ancora opportuniste patologiche per l'uomo e per gli animali.

Gli Stafilococchi, e in particolare *Staphylococcus aureus*, intervengono in patologia umana soprattutto come agenti eziologici di numerose infezioni della cute e delle mucose determinando, in alcuni casi, anche setticemie estremamente gravi. Alcuni biotipi appartenenti alla specie *St. aureus* sono responsabili di gravi tossinfezioni alimentari per la capacità di produrre enterotossine termoresistenti e attive per ingestione.

La ricerca degli Stafilococchi patogeni nelle acque potabili è significativa in quanto gli organismi sono in grado di sopravvivere in condizioni ambientali sfavorevoli. Pertanto nel controllo delle acque potabili rappresentano un importante indice di contaminazione e, resistenti all'azione del cloro, possono considerarsi una spia dell'efficienza del trattamento subito dall'acqua. In particolare, quando stafilococchi colonizzano la rete di distribuzione, sono in grado di installarsi nei serbatoi, nei rompigitto e nei potabilizzatori domestici, raggiungendo cariche batteriche elevate con possibilità di produzione significativa di enterotossine. Acque destinate al consumo umano contenenti tossine stafilococciche possono successivamente contaminare alimenti e bevande.

Il parametro Stafilococchi patogeni, di cui è prescritta l'assenza obbligatoria nelle acque destinate al consumo umano, è inserito tra quelli indicati nell'Avvertenza dell'Allegato I del DL.vo n. 31 del 2001 e successive modifiche e integrazioni.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS A [018A rev. 00; 018B rev. 00] vengono utilizzate per la determinazione degli Stafilococchi patogeni, come *St. aureus*, nelle acque da destinare e destinate al consumo umano, eventualmente nelle acque di piscina, nelle acque trattate e nel dialisato standard quando trattasi di acque e soluzioni di dialisi.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo - ISS A 018A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Il metodo analitico si basa sulla filtrazione di un volume noto di acqua e sul conteggio delle colonie

sviluppate su una membrana posta ad incubare su un idoneo terreno agarizzato. Sono previste prove di conferma.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice).

2.1.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 250 mL o a 100 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. Terreno di base Agar Baird Parker

Composizione	
Triptone	10 g
Estratto di carne	5 g
Estratto di lievito	1 g
Glicina	12 g
Piruvato di sodio	10 g
Cloruro di litio	5 g
Agar	20 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 6,8±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa dissoluzione dei componenti. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Lasciare raffreddare fino alla temperatura di $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$ prima di aggiungere il supplemento.

2.1.4.2. Emulsione di tuorlo d'uovo e tellurito di potassio al 3,5%

L'emulsione, già pronta, è disponibile in commercio. Il tellurito di potassio è classificato come Xi - Irritante. Nella manipolazione seguire le istruzioni della ditta produttrice e adottare precauzioni per la protezione respiratoria, delle mani e della pelle.

2.1.4.3. Terreno completo Agar Baird Parker

Composizione	
Terreno di base (2.1.4.1.)	1000 mL
Emulsione di tuorlo d'uovo (2.1.4.2.)	50 mL

Aggiungere ad 1 L di terreno di base (2.1.4.1.) 50 mL di emulsione di tuorlo d'uovo al tellurito di potassio (2.1.4.2.). Agitare per ottenere una soluzione omogenea e distribuire, rispettando le comuni regole di asepsi, in capsule di Petri.

Il terreno, pronto per l'uso, può essere conservato a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di 7 giorni in condizioni ottimali.

2.1.4.4. Brodo Nutritivo

Composizione	
Estratto di carne	3 g
Peptone	5 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 6,8±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata, seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Distribuire in tubi in ragione di circa di 10 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti.

Il terreno pronto per l'uso può essere conservato a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

2.1.4.5. Infuso Cuore Cervello

Composizione		
Infuso di cervello di vitello	200	g
Infuso di cuore di bue	250	g
Peptocomplex	10	g
Glucosio	2	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio fosfato bibasico	2,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH $7,4 \pm 0,2$		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Distribuire in tubi in ragione di circa di 10 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti.

Il terreno preparato, pronto per l'uso, può essere conservato al buio ad una temperatura inferiore a 20°C .

Il substrato può essere utilizzato in alternativa al Brodo Nutritivo (2.1.4.4.).

2.1.4.6. 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. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa dissoluzione degli ingredienti. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Raffreddare fino alla temperatura di $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$ e distribuire in capsule di Petri.

Il terreno pronto per l'uso può essere conservato a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

2.1.4.7. Acqua ossigenata al 3%

La soluzione, necessaria per la prova della catalasi, è disponibile in commercio alla concentrazione indicata e pronta per l'uso. Conservare al riparo dalla luce diretta alla temperatura di $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$.

2.1.4.8. Plasma EDTA o Plasma citrato per la coagulasi

Il plasma di coniglio, necessario per l'individuazione di *St. aureus* coagulasi positivo, si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il contenuto del flacone con acqua distillata sterile, seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Il plasma ricostituito può essere conservato a $(2 \div 8)^\circ\text{C}$ per 15 giorni e fino a 30 giorni a temperatura intorno a -20°C . Ogni partita di plasma va saggiata con un ceppo di controllo coagulasi positivo (*St. aureus* ATCC 27217) e un ceppo di controllo coagulasi negativo (*St. simulans* ATCC 11631). In alternativa ai materiali di riferimento indicati, utilizzare colture comunque certificate.

È possibile anche servirsi dei test di agglutinazione al lattice disponibili in commercio, che possono sostituire i test per la prova della coagulasi.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Filtrazione e incubazione

Filtrare almeno 250 mL di campione attraverso una membrana sterile di esteri di cellulosa 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 0,7/0,2 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, seguendo scrupolosamente le norme di asepsi. Trasferire la membrana sul substrato di isolamento Agar Baird Parker (2.1.4.3.). Incubare a (36 ± 1) °C per (24 + 24) ore.

2.1.5.2. Identificazione e conteggio delle colonie

I microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* coagulasi positivi producono sul substrato di isolamento colonie nere per effetto della riduzione del tellurito a tellurio metallico. Dopo 24 ore di sviluppo le colonie, che appaiono brillanti, lisce e convesse con margini netti, circondate in genere da un alone chiaro dovuto all'attività lecitinasica si presentano con un diametro di $(1 \div 1,5)$ mm; dopo 48 ore di incubazione hanno comunemente un diametro di $(1,5 \div 2,5)$ mm. Le specie appartenenti al genere *Staphylococcus* coagulasi negative sviluppano, invece, colonie nere con margini irregolari, non circondate da alone trasparente.

Per verificare la presenza di stafilococchi patogeni, e di *St. aureus* in particolare, è opportuno sottoporre a prove di conferma le colonie nere con alone. È possibile procedere all'identificazione delle specie con le prove biochimiche dei kit miniaturizzati, disponibili in commercio.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *St. aureus* ATCC 6538 o *St. aureus* ATCC 25923 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.5.3. Conferma

Per l'accertamento dell'appartenenza dei microrganismi a specie patogene di *Staphylococcus*, è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma:

- prova della catalasi;
- prova della coagulasi.

Prima di effettuare ciascuna prova, è necessario prelevare con un'ansa sterile le colonie sospette sviluppatasi sul substrato di isolamento (2.1.4.3.) isolandole su Agar Nutritivo (2.1.4.6.). Incubare a (36 ± 1) °C per $(22 \div 26)$ ore. Eseguire tutte le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.1.5.4. Prova della presenza dell'enzima catalasi

La prova differenzia i microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* da quelli appartenenti al genere *Streptococcus*. Stemperare su un vetrino portaoggetti una colonia cresciuta su Agar Nutritivo (2.1.4.6.) e ricoprirla con alcune gocce di acqua ossigenata al 3% (2.1.4.7.).

La presenza dell'enzima catalasi è rilevata dallo sviluppo immediato di bollicine di gas.

I microrganismi del genere *Staphylococcus* sono catalasi positivi.

2.1.5.5. Prova della presenza dell'enzima coagulasi

La prova evidenzia l'attività coagulante esercitata dagli stafilococchi potenzialmente patogeni sul plasma. Tale attività è dovuta ad almeno due fattori: coagulasi libera (enzima 0) e coagulasi legata o clumping factor (antigene della parete cellulare).

L'enzima è presente nella maggior parte dei biotipi, appartenenti alla specie *Staphylococcus aureus* e in biotipi appartenenti alle specie *St. intermedius* e *St. hyicus*, opportunisti patogeni per gli animali ed è sempre assente nelle specie saprofiti e commensali.

2.1.5.6. Prova in provetta per la ricerca della coagulasi libera

Prelevare con un'ansa sterile una colonia cresciuta su Agar Nutritivo (2.1.4.6.), stemperarla in Brodo Nutritivo (2.1.4.4.) o in Infuso Cuore Cervello (2.1.4.5.). Incubare a (36 ± 1) °C per $(22 \div 26)$ ore.

Dosare in una provetta sterile 0,5 mL di plasma EDTA o plasma citrato (2.1.4.8.) e 0,5 mL della brodocoltura sviluppatasi in Brodo Nutritivo o in Infuso Cuore Cervello, utilizzando pipette sterili. In alternativa, emulsionare 2-4 colonie, cresciute su Agar Nutritivo (2.1.4.6.), nella provetta contenente il plasma EDTA o citrato; miscelare delicatamente e incubare a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$, preferibilmente in bagno termostato. Durante le prime 4 ore d'incubazione, effettuare la lettura ogni ora, inclinando la provetta da un lato con cura e senza agitare. Nei due terzi o in tutto il mezzo culturale la presenza dell'enzima coagulasi è rivelata da un coagulo ben gelificato. Se la prova risulta negativa, incubare ancora la provetta e ripetere la lettura dopo altre (22-26) ore. Il test in provetta accerta sia la coagulasi libera sia la coagulasi legata.

2.1.5.7. Prova per la ricerca della coagulasi legata

Prelevare con un'ansa sterile una colonia cresciuta su Agar Nutritivo (2.1.4.6.), stemperarla in una goccia d'acqua su un vetrino portaoggetti. Miscelare la sospensione ottenuta con un'ansata di plasma EDTA o plasma citrato (2.1.4.8.). Gli Stafilococchi positivi alla coagulasi legata producono ammassi macroscopici entro (5 ± 15) sec. Se un biotipo è positivo alla coagulasi legata è sicuramente positivo anche alla coagulasi libera, se è negativo alla coagulasi legata può essere sia negativo che positivo alla coagulasi libera; pertanto è necessario confermare la prova su vetrino con quella in provetta.

Il test è indicato come tecnica di screening in presenza di numerosi campioni.

2.1.6. Espressione dei risultati

Riportare il numero degli Stafilococchi patogeni o di *St. aureus* in funzione del volume di riferimento. Per le acque destinate al consumo umano in distribuzione è, in alternativa, possibile esprimere il risultato come Presente o Assente/250 mL; per le acque di piscina il valore deve essere riferito a 100 mL.

Qualora si sia proceduto allo svolgimento delle prove di conferma, il numero dei microrganismi appartenenti al gruppo degli stafilococchi patogeni si calcola in base al numero di colonie contate e già sottoposte a conferma, riportando il valore riferito a 250 mL o 100 mL di campione.

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero dei microrganismi presenti in 250 mL o 100 mL del campione in base alla seguente formula:

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

dove

<i>C</i>	numero di colonie che sono state confermate per 250 mL o 100 mL
<i>A</i>	numero di colonie confermate
<i>B</i>	numero di colonie sottoposte a conferma
<i>N</i>	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
<i>V_t</i>	volume di campione analizzato (in mL)
<i>V_s</i>	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (250 mL o 100 mL)
<i>F</i>	eventuale fattore di diluizione

2.2. Metodo - ISS A 018B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Il metodo analitico si basa sulla filtrazione di un volume noto di acqua e sul conteggio delle colonie sviluppate su una membrana posta ad incubare su un idoneo terreno agarizzato. Sono previste prove di conferma.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice).

2.2.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 250 mL o 100 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. Substrato d'isolamento Agar Sale Mannite

Composizione		
Estratto di carne	1	g
Peptocomplex	10	g
Mannitolo	10	g
Sodio cloruro	75	g
Rosso fenolo	0,025	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa dissoluzione dei componenti. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Raffreddare fino alla temperatura di (50 ± 5) °C e distribuire in capsule di Petri.

Il terreno pronto per l'uso può essere conservato a (5 ± 3) °C per non più di 7 giorni in condizioni ottimali.

2.2.4.2. Brodo Nutritivo

Composizione		
Estratto di carne	3	g
Peptone	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Distribuire in tubi in ragione di circa di 10 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti.

Il terreno pronto per l'uso può essere conservato a (5 ± 3) °C per non più di un mese in condizioni ottimali.

2.2.4.3. Infuso Cuore Cervello

Composizione		
Infuso di cervello di vitello	200	g
Infuso di cuore di bue	250	g
Peptocomplex	10	g
Glucosio	2	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio fosfato bibasico	2,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Distribuire in tubi in ragione di circa di 10 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti.

Il terreno preparato, pronto per l'uso, può essere conservato al buio ad una temperatura inferiore a 20 °C.

Il substrato può essere utilizzato in alternativa al Brodo Nutritivo (2.2.4.2.).

2.2.4.4. 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. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa dissoluzione dei componenti. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per 15 minuti. Raffreddare fino alla temperatura di circa (50 ± 5) °C e distribuire in capsule di Petri.

Il terreno pronto per l'uso può essere conservato a (5 ± 3) °C per non più di un mese in condizioni ottimali.

2.2.4.5. Acqua ossigenata al 3%

La soluzione, necessaria per la prova della catalasi, è disponibile in commercio alla concentrazione indicata e pronta per l'uso. Conservare al riparo dalla luce diretta alla temperatura di (5 ± 3) °C.

2.2.4.6. Plasma EDTA o Plasma citrato

Il plasma di coniglio, necessario per l'individuazione di *St. aureus* coagulasi positivo, si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il contenuto del flacone con acqua distillata sterile, seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Il plasma ricostituito può essere conservato a $(2 \div 8)$ °C per 15 giorni e fino a 30 giorni a temperatura intorno a - 20 °C. Ogni partita di plasma va saggiata con un ceppo di controllo coagulasi positivo (*St. aureus* ATCC 27217) e un ceppo di controllo coagulasi negativo (*St. simulans* ATCC 11631). In alternativa ai materiali di riferimento indicati, utilizzare colture comunque certificate.

È possibile anche servirsi dei test di agglutinazione al lattice disponibili in commercio, che possono sostituire i test per la prova della coagulasi.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Filtrazione e incubazione

Filtrare almeno 250 mL di campione attraverso una membrana sterile di esteri di cellulosa 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 0,7/0,2 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, seguendo scrupolosamente le norme di asepsi. Trasferire la membrana sul substrato di isolamento Agar Sale Mannite (2.2.4.1.). Incubare a (36 ± 1) °C per $(33 \div 37)$ ore.

2.2.5.2. Identificazione e conteggio delle colonie

I microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* coagulasi-positivi producono su Agar Sale Mannite (2.2.4.1.) larghe colonie gialle circondate da un alone giallo. La produzione di acido, dovuta alla fermentazione del mannitolo, provoca l'abbassamento del pH e il viraggio dell'indicatore del terreno (rosso fenolo) dal rosso al giallo.

Le specie appartenenti al genere *Staphylococcus* coagulasi negative sviluppano invece, colonie piccole di colore rosso porpora.

Per verificare la presenza di stafilococchi patogeni, e di *St. aureus* in particolare, è opportuno sottoporre a prove di conferma le colonie. È possibile procedere all'identificazione delle specie con le prove biochimiche dei kit miniaturizzati, disponibili in commercio.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *St. aureus* ATCC 25923 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

2.2.5.3. Conferma

Per l'accertamento dell'appartenenza dei microrganismi a specie patogene del genere *Staphylococcus*, è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma:

- prova della catalasi;
- prova della coagulasi.

Prima di effettuare ciascuna prova, è necessario prelevare con un'ansa sterile le colonie sospette sviluppatesi sul substrato di isolamento (2.2.4.1.) isolandole su Agar Nutritivo (2.2.4.4.). Incubare a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(22 \div 26)$ ore. Eseguire tutte le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.2.5.4. Prova della presenza dell'enzima catalasi

La prova differenzia i microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* da quelli appartenenti al genere *Streptococcus*. Stemperare su un vetrino portaoggetti una colonia cresciuta su Agar Nutritivo (2.2.4.4.) e ricoprirla con alcune gocce di acqua ossigenata al 3% (2.2.4.5.).

La presenza dell'enzima catalasi è rilevata dallo sviluppo immediato di bollicine di gas.

I microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* sono catalasi positivi.

2.2.5.5. Prova della presenza dell'enzima coagulasi

La prova evidenzia l'attività coagulante esercitata dagli stafilococchi potenzialmente patogeni sul plasma. Tale attività è dovuta ad almeno due fattori: coagulasi libera (enzima extracellulare) e coagulasi legata o clumping factor (antigene della parete cellulare).

L'enzima è presente nella maggior parte dei biotipi, appartenenti alla specie *Staphylococcus aureus* e in biotipi appartenenti alle specie *St. intermedius* e *St. hyicus*, opportunisti patogeni per gli animali ed è sempre assente nelle specie saprofiti e commensali.

2.2.5.6. Prova in provetta per la ricerca della coagulasi libera

Prelevare con un'ansa sterile una colonia cresciuta su Agar Nutritivo (2.2.4.4.), stemperarla in Brodo Nutritivo (2.2.4.2.) o in Infuso Cuore Cervello (2.2.4.3.). Incubare a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(22 \div 26)$ ore.

Dosare in una provetta sterile 0,5 mL di plasma EDTA o plasma citrato (2.1.4.8.) e 0,5 mL della brodocoltura sviluppatesi in Brodo Nutritivo o in Infuso Cuore Cervello, utilizzando pipette sterili.

In alternativa, emulsionare 2-4 colonie, cresciute su Agar Nutritivo (2.2.4.4.), nella provetta contenente il plasma EDTA o citrato; miscelare delicatamente e incubare a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$, preferibilmente in bagno termostato. Durante le prime 4 ore d'incubazione, effettuare la lettura ogni ora, inclinando la provetta da un lato con cura e senza agitare. Nei due terzi o in tutto il mezzo colturale la presenza dell'enzima coagulasi è rivelata da un coagulo ben gelificato. Se la prova risulta negativa, incubare ancora la provetta e ripetere la lettura dopo altre $(22 \div 26)$ ore.

Il test in provetta accerta sia la coagulasi libera sia la coagulasi legata.

2.2.5.7. Prova per la ricerca della coagulasi legata

Prelevare con un'ansa sterile una colonia cresciuta su Agar Nutritivo (2.2.4.4.), stemperarla in una goccia d'acqua su un vetrino portaoggetti. Miscelare la sospensione ottenuta con un'ansata di plasma EDTA o plasma citrato (2.2.4.6.). Gli Stafilococchi positivi alla coagulasi legata producono ammassi macroscopici entro $(5 \div 15)$ sec. Se un biotipo è positivo alla coagulasi legata è sicuramente positivo anche alla coagulasi libera, se è negativo alla coagulasi legata può essere sia negativo che positivo alla coagulasi libera; pertanto è necessario confermare la prova su vetrino con quella in provetta.

Il test è indicato come tecnica di screening in presenza di numerosi campioni.

2.2.6. Espressione dei risultati

Riportare il numero degli Stafilococchi patogeni o di *St. aureus* in funzione del volume di riferimento. Per le acque destinate al consumo umano in distribuzione è, in alternativa, possibile esprimere il risultato come Presente o Assente/250 mL; per le acque di piscina il valore deve essere riferito a 100 mL.

Qualora si sia proceduto allo svolgimento delle prove di conferma, il numero dei microrganismi appartenenti al gruppo degli stafilococchi patogeni si calcola in base al numero di colonie contate e già sottoposte a conferma, riportando il valore riferito a 250 mL o 100 mL di campione.

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero dei microrganismi presenti in 250 mL o 100 mL del campione in base alla seguente formula:

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

dove

<i>C</i>	numero di colonie che sono state confermate per 250 mL o 100 mL
<i>A</i>	numero di colonie confermate
<i>B</i>	numero di colonie sottoposte a conferma
<i>N</i>	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
<i>V_t</i>	volume di campione analizzato (in mL)
<i>V_s</i>	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (250 mL o 100 mL)
<i>F</i>	eventuale fattore di diluizione

Bibliografia

1. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS, Wood WB, McCarty M. *Trattato di Microbiologia*. Padova: Piccin Editore; 1981.
2. Floccia M. Stafilococchi patogeni nell'ambiente idrico. In: Zavatti A (Ed.). *Microbiologia delle acque potabili*. Bologna: Pitagora Editrice; 1989. p. 31-39.
3. Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale* - Serie Generale n. 52, 3 marzo 2001.
4. Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2002, n. 27. Modifiche e integrazioni al decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31, recante attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale* - Serie Generale n. 58, 9 marzo 2002.
5. Sneath PHA (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol 2. Baltimore: William and Wilkins Co.; 1996.

APPENDICE

Attrezzature di base per le analisi microbiologiche delle acque

INTRODUZIONE

Le indagini microbiologiche presuppongono l'uso di specifiche attrezzature di laboratorio. Di seguito vengono indicate e descritte alcune attrezzature di uso più comune nei laboratori per l'analisi microbiologica delle acque.

Per l'esecuzione di prove microbiologiche su acque destinate al consumo umano è opportuno seguire procedure idonee, dettagliate di seguito e riferite alle prescrizioni di carattere generale riportate nella norma UNI 10674.

Per l'organizzazione di un laboratorio di microbiologia è comunque necessario attenersi a quanto definito, in relazione all'uso delle attrezzature di laboratorio, dal D.Lvo 626/94 e s.m.i. che così stabilisce: "all'atto della scelta delle attrezzature, il datore di lavoro prende in considerazione: le condizioni e le caratteristiche specifiche del lavoro da svolgere; i rischi presenti nell'ambiente di lavoro; i rischi derivanti dall'impiego delle attrezzature stesse".

Per ottenere elevati standard di sicurezza e prevenzione per coloro che lavorano in laboratorio è necessario che gli operatori siano comunemente adeguatamente informati sui rischi e sulle corrette modalità di utilizzo delle apparecchiature presenti nel laboratorio, nonché sulle modalità di manipolazione di matrici di diversa natura, sull'uso delle cappe biohazard e dei dispositivi di protezione individuale. È opportuno anche pianificare un sistema che preveda lo svolgimento di attività di formazione per l'acquisizione delle conoscenze e delle capacità sull'attuale normativa in materia di prevenzione dei rischi derivanti dall'uso di sostanze chimiche, di agenti fisici e di agenti biologici in ambiente laboratoristico, sulle metodologie di valutazione del rischio, sull'uso e il corretto impiego dei dispositivi di protezione individuale e sulla gestione delle emergenze.

In considerazione del gruppo di appartenenza degli agenti biologici con cui si opera in laboratorio, per uso deliberato o per esposizione potenziale, i laboratori devono garantire le misure e i livelli di contenimento di cui all'Allegato XII del D.Lvo 626/94. Pertanto, le caratteristiche strutturali per i laboratori di base, dove vi è uso di materiali con possibile contaminazione da agenti patogeni per l'uomo, devono essere tali da assicurare spazi interni tali da garantire gli spostamenti e le attività in sicurezza, evitando possibili scontri accidentali contro le apparecchiature o tra gli operatori. Quindi, prima dell'acquisto di qualsiasi apparecchiatura per il laboratorio è necessario sia definito, all'interno dei locali, il posizionamento della strumentazione da acquistare. Dovrà essere pertanto valutato che lo spazio e la collocazione assegnati allo strumento siano idonei per l'esecuzione delle Procedure Operative Standard; le condizioni ambientali (temperatura, umidità, insolazione) e al contorno (es. presenza di vibrazioni) siano adeguate e siano rispettate le norme di sicurezza sia in rapporto ad eventuali rischi ambientali (diffusione di bioaerosol e polveri, di sostanze tossiche), sia in relazione alle strutture e agli impianti.

APPARECCHIATURE PER LA MISURA DEL PH

Il pH dei terreni di coltura e delle soluzioni può essere determinato per via colorimetrica con l'uso di appropriati indicatori (quando non vi siano interferenze provocate dal colore del terreno) effettuando la lettura con l'impiego di comparatori muniti degli appositi dischi o con altro dispositivo appropriato. Tuttavia, le determinazioni possono essere effettuate con più precisione e speditamente per via potenziometrica con l'uso di piaccametri che devono avere una precisione di misura di $\pm 0,1$ unità di pH a 20 °C.

Apparecchi per sterilizzazione

Autoclavi

La sterilizzazione a vapore saturo sotto pressione (per terreni di coltura, bottiglie da prelievo, attrezzature filtranti, ecc.) richiede l'impiego di autoclavi di capacità adeguate al materiale da sterilizzare che non dovrà essere eccessivamente ammassato. La sterilizzazione di norma si effettua alla temperatura di (121 ± 3) °C con una atmosfera di pressione per un tempo di 15 minuti.

Per il corretto uso dell'autoclave attenersi scrupolosamente alle indicazioni del costruttore.

Stufe a secco

Le stufe devono consentire il raggiungimento della temperatura di (170 ± 10) °C per circa 2 ore. È necessario che siano corredate di un termometro a gambo lungo, di precisione accettabile nell'intervallo fra 160 °C e 180 °C e di un idoneo sistema di termoregolazione. È altresì opportuno che siano fornite di un sistema di interruttore a tempo che consenta di programmare il tempo di sterilizzazione.

Lampade a raggi UV

I sistemi di sterilizzazione con raggi ultravioletti (UV) sono particolarmente idonei per la sterilizzazione dell'ambiente sotto cappa o per piccoli locali. È da tenere presente che la vita media di una lampada a UV è di circa 5000 ore e che comunque è necessario effettuare, per mantenerne l'efficacia, una sua manutenzione periodica (pulizia con eliminazione della polvere, ecc.).

Per l'individuazione di alcuni microrganismi cresciuti in brodi o terreni di coltura si ricorre, in alcuni casi, all'uso di una speciale lampada a raggi ultravioletti, la lampada di Wood, che permette di evidenziare la presenza dei microrganismi specifici che, ad una determinata lunghezza d'onda, fluorescono.

L'uso di lampade a raggi ultravioletti richiede precauzioni per evitare danni agli occhi e alla pelle degli operatori.

Attrezzature per l'incubazione

Armadi termostatici, camere termostatiche e termostati

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata e assicurare nei vari scomparti una temperatura costante, entro limiti di variazione non eccedenti ± 1 °C. Sono preferibili gli armadi termostatici a camicia d'acqua. Sia gli armadi termostatici che le camere termostatiche e i termostati dovranno essere muniti di un doppio sistema di termoregolazione, uno per il mantenimento della temperatura di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura lievemente superiore (temperatura massima di sicurezza) che non dovrà mai essere superata.

Di norma vengono utilizzati incubatori regolabili da temperatura ambiente a 80 °C. Per temperature intorno ai 20 °C sono comunque da utilizzare frigotermostati. Essi devono garantire la temperatura di incubazione prevista dal metodo analitico.

È opportuno che queste apparecchiature siano provviste inoltre di termometri per il controllo visivo della temperatura, con una scala che consenta la lettura di 1 °C, o di un display e, possibilmente, di un sistema termometrico di registrazione.

Gli armadi termostatici di notevoli dimensioni e le camere termostatiche dovranno essere muniti di un idoneo sistema di circolazione dell'aria che consenta il mantenimento della temperatura richiesta in tutti i punti del vano.

È altresì opportuno che queste apparecchiature siano dotate di un sistema che consenta il mantenimento di un livello di umidità compreso fra il 75 e l'80%. Ciò può essere ottenuto anche con un recipiente contenente acqua, collocato sul fondo.

Il materiale posto ad incubare dovrà essere disposto in modo da consentire la circolazione del calore e non essere eccessivamente ammassato.

Bagni termostatici

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata ed essere provvisti di un doppio sistema di controllo della temperatura costituito da un sistema di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura superiore (temperatura di sicurezza) che non dovrà mai essere superata. Dovranno inoltre essere provvisti di termometri per il controllo visivo della temperatura e possibilmente di un sistema termometrico di registrazione ed eventualmente di un idoneo sistema di agitazione dell'acqua. Per il loro riempimento è necessario utilizzare acqua distillata che deve essere comunque rinnovata regolarmente. Per evitare fenomeni di corrosione è opportuno utilizzare filiere o idonei cestelli di acciaio inossidabile o di materiale plastico idoneo. L'eventuale sviluppo di alghe o di funghi nell'acqua deve essere eliminato mediante l'uso di composti ammoniacali quaternari da fare agire per circa 24 ore, provvedendo poi allo svuotamento, risciacquo e successivo riempimento con acqua distillata.

Bilance

In laboratori attrezzati per l'esecuzione di indagini microbiologiche può essere sufficiente disporre di bilance che permettono di pesare quantità intorno a 150 g con sensibilità di 0,1 g.

Per la pesata di additivi, reagenti, coloranti ecc., è necessario disporre di una bilancia analitica con una sensibilità di 0,1 mg.

Cappe a flusso laminare

Per garantire la qualità del dato analitico e la protezione dell'operatore devono essere utilizzate cappe di sicurezza. Di norma, per eseguire analisi microbiologiche ambientali che prevedano la ricerca di microrganismi a rischio basso o moderato (gruppi 2 e 3 del D.Lvo. 626/1994) vengono utilizzate cappe a flusso laminare di classe IIA. Sono cappe a flusso verticale, aperte frontalmente e progettate per la protezione dell'operatore, del prodotto al suo interno e dell'ambiente circostante.

Le cappe biologiche devono essere collocate in locali esenti da correnti d'aria e lontane da impianti di condizionamento e finestre.

Centrifughe

Possono essere utilizzate centrifughe da banco e da terra con rotori ad inclinazione fissa o variabile. Possono essere refrigerate o meno in base alle necessità. È necessario utilizzare centrifughe realizzate secondo le norme di sicurezza internazionali.

Frigoriferi e congelatori

Frigoriferi e congelatori devono avere un dispositivo di rilevazione della temperatura e impiegare per il controllo interno un termometro a minima e a massima oppure un termometro con bulbo immerso in glicerolo.

I frigoriferi devono assicurare una temperatura di $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ e i congelatori da utilizzare possono essere quelli che raggiungono temperature di $(-20 \pm 3) ^\circ\text{C}$ e $(-70 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

Membrane filtranti e apparecchiature per filtrazione

Membrane filtranti

Le membrane filtranti per uso batteriologico sono generalmente costituite da dischi di esteri di cellulosa con pori uniformemente distribuiti; sono comunque utilizzate, per situazioni particolari, anche membrane di nylon e policarbonato. Generalmente per le analisi microbiologiche si utilizzano membrane con pori aventi un diametro nominale di $0,45 \mu\text{m}$ ($\pm 0,02 \mu\text{m}$) (pori simmetrici da $0,45 \mu\text{m}$ oppure pori asimmetrici da $0,7/0,2 \mu\text{m}$). Le membrane, a causa della loro porosità hanno la capacità di trattenere sulla loro superficie, all'atto della filtrazione, i batteri contenuti nell'acqua che svilupperanno colonie sulla superficie della membrana, dopo un idoneo periodo di incubazione, per passaggio per capillarità dei principi del terreno colturale.

Esistono in commercio membrane filtranti di vario diametro. Per l'esame batteriologico delle acque vengono normalmente utilizzate membrane del diametro di 47-50 mm.

In commercio si trovano confezioni già sterili pronte per l'uso, in genere sterilizzate con raggi gamma o con ossido di etilene.

Le membrane si differenziano a seconda della ditta di produzione. Problemi si possono verificare in relazione al tipo di membrane utilizzate: inibizione batterica in corrispondenza della linea del reticolo, sciamaatura delle colonie, crescita lungo la linea del reticolo, presenza di zone idrofobiche. Per evitare, pertanto, l'uso di membrane non idonee, sarebbe consigliabile verificarne l'efficienza prima delle analisi.

Apparecchiature per la filtrazione

Nel caso dell'esame batteriologico delle acque, vengono di norma utilizzate apparecchiature idonee per la filtrazione di piccoli volumi per i controlli di routine. Dette apparecchiature devono essere adatte per l'impiego di membrane filtranti del diametro di 47-50 mm. Sono costituite da una rampa con supporti e contenitori che possono essere in acciaio inossidabile, vetro, policarbonato o polipropilene. Possono essere impiegate apparecchiature singole o in serie, utilizzando, come sistema aspirante, una pompa da vuoto azionata elettricamente o una pompa ad acqua. È essenziale che fra sistema filtrante e sistema aspirante sia interposto un idoneo sistema per la raccolta dell'acqua filtrata.

I supporti e i contenitori devono essere sterilizzati in autoclave a $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per 15 minuti, dopo accurato lavaggio e asciugatura e prima della sterilizzazione devono essere avvolti in carta idonea per mantenere la sterilità durante la conservazione prima dell'uso. Possono essere utilizzati entro due settimane dalla sterilizzazione, se conservati in condizioni ottimali.

Apparecchiature per il supporto di membrane di diametro più grande (ad esempio, 120 mm), in genere di acciaio inossidabile, sono utilizzate per filtrazioni di volumi maggiori di acqua.

Microscopio ottico

Per le normali procedure di analisi microbiologica (es. colorazione di Gram) è sufficiente disporre di un microscopio ottico con obiettivi 10x, 40x e 100x, vetrini portaoggetti e coprioggetti e olio ad immersione. Dopo ogni utilizzo rimuovere il residuo di olio sulle lenti con carta ottica.

Sistemi per anaerobiosi

Consistono in giare, incubatori o altri sistemi a tenuta, idonei a creare aree a composizione gassosa controllata. Le condizioni di anaerobiosi devono essere verificate con appositi dispositivi. Per il loro corretto uso attenersi scrupolosamente alle indicazioni della ditta produttrice.

Vetreteria e materiale monouso

È da preferire la vetreteria fabbricata con vetro neutro, resistente alle temperature di sterilizzazione. Prima della sterilizzazione – da effettuare con calore secco alla temperatura di (180 ± 3) °C per 30 min o con calore umido a (121 ± 3) °C per 15 minuti – la vetreteria deve essere accuratamente lavata in modo da assicurare la completa eliminazione di residui organici o di sostanze che possono esplicare azione antibatterica. Per il controllo della sterilizzazione utilizzare prodotti specifici: indicatori biologici o integratori chimico-fisici per la verifica della sterilizzazione a calore umido e indicatori biologici per la verifica della sterilizzazione a calore secco.

Dopo lavaggio e asciugatura la vetreteria, per essere sterilizzata, deve essere confezionata in modo idoneo a consentire il mantenimento della sterilità durante la conservazione.

Negli ultimi anni si è andato sempre più diffondendo l'uso di materiali plastici monouso, forniti in confezioni già sterili. Il vantaggio di usare questi materiali è legato soprattutto al risparmio di manodopera impiegata nelle lunghe procedure di lavaggio, confezionamento e sterilizzazione dei materiali in vetro. I materiali plastici da usare nel laboratorio batteriologico devono però essere esenti da residui tossici della lavorazione, essere trasparenti e avere segni di calibrazione che corrispondano a precise indicazioni volumetriche.

Esistono in commercio anche articoli in materiale plastico che possono essere utilizzati e sottoposti a ripetute sterilizzazioni in autoclave.

Bottiglie per il prelievo

Possono essere di vetro neutro, resistenti alla sterilizzazione, da chiudere con tappo smerigliato o con idoneo tappo a vite. Prima della sterilizzazione, le bottiglie con tappo smerigliato debbono essere provviste di un cappuccio di copertura in carta resistente e impermeabile o in foglio di alluminio. Tale tipo di protezione non è richiesto per le bottiglie munite di tappo a vite. Per il campionamento possono essere anche utilizzate bottiglie monouso in materiale plastico, disponibili in commercio già sterili, in genere in confezioni multiple.

Bottiglie e tubi per diluizione, beute, cilindri tarati

È da utilizzare preferibilmente materiale in vetro, resistente alla sterilizzazione.

Le bottiglie e i tubi per diluizione dovranno essere provvisti di tappo smerigliato, a scatto, di gomma o a vite. Possono essere impiegate anche bottiglie (o tubi) di plastica, fabbricate con materiale idoneo e non tossico e resistenti alla sterilizzazione in autoclave.

Pipette e micropipette

Per le varie operazioni di analisi occorrono pipette di varia capacità (da 1, da 5 e da 10 mL) graduate fino alla punta, con suddivisione a 0,1 mL.

Sono disponibili in commercio confezioni di pipette monouso in materiale plastico, di varia misura, già sterili. Per piccoli volumi possono essere comunque utilizzate micropipette manuali, elettroniche, monocanale o multicanale da utilizzarsi con appositi puntali monouso.

Nell'eventualità si utilizzino pipette di vetro riutilizzabili, prima della sterilizzazione, esse dovranno essere munite di filtro di cotone grezzo all'estremità superiore. Le pipette vanno sterilizzate in confezione singola o multipla (in apposite custodie in metallo, preferibilmente acciaio inossidabile, o in vetro).

Per la sicurezza dell'operatore è necessario non pipettare con la bocca, ma utilizzare sempre sistemi di aspirazione tipo pompe aspiranti a bulbo di gomma o pipettatrici automatiche.

Tubi per coltura

I tubi vengono usati per la tecnica dei tubi multipli, per l'esecuzione di test biochimici, per la conservazione di colture batteriche, ecc. Si utilizzano tubi di diverse dimensioni in relazione all'utilizzo. I tubi devono essere chiusi utilizzando preferibilmente tappi in metallo, in materiale plastico o in cotone grezzo. Sono decisamente da preferire i tubi in vetro resistente alla corrosione e alla sterilizzazione, mentre i tubi monouso sono sconsigliabili.

Capsule di Petri

L'uso delle capsule di Petri è indispensabile per l'isolamento di colture batteriche e per l'analisi effettuata con la tecnica della filtrazione su membrana. Vengono utilizzate capsule di Petri di varie dimensioni. Il tipo più diffuso ha un diametro di circa 100 mm e un'altezza di 15 mm. Per la filtrazione dell'acqua, poiché la tecnica standardizzata prevede l'utilizzo di membrane di 47 mm di diametro, si possono usare capsule di diametro anche di 50 mm e dello spessore di 12 mm.

Capsule di Petri in vetro sono state usate per lungo tempo in batteriologia. Negli ultimi anni esse sono state quasi totalmente sostituite da piastre monouso, in materiale plastico che si trovano in commercio già sterili in confezioni sigillate.

Indipendentemente dal materiale (vetro o plastica) le capsule di Petri devono essere con il fondo perfettamente piano e perfettamente trasparenti al fine di rendere ottimale il riconoscimento delle colonie.

Bibliografia

1. American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 21th, ed. Washington, DC: APHA; 2005.
2. UNI 10674. *Acque destinate al consumo umano. Guida generale per le determinazioni microbiologiche*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Litografia Chicca di Fausto Chicca
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, marzo 2007 (n. 1) 6° Suppl.