

DETERMINAZIONE DEGLI STAFILOCOCCI PATOGENI

0. Generalità e definizioni

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, ed altre ancora opportuniste patogene per l'uomo e per gli animali.

Gli Stafilococchi, ed 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 Decreto Legislativo n. 31 del 2001 e successive modifiche ed integrazioni.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche sotto riportate sono utilizzate per il rilevamento degli stafilococchi patogeni nelle acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinare al consumo umano e nelle acque ad uso ricreativo (piscine).

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo 1

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 1).

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 ± 3) °C per 15 minuti. Lasciare raffreddare fino alla temperatura di (50 ± 5) °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 $6,8 \pm 0,2$		

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 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 $20 ^\circ\text{C}$.

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 $(2-8) ^\circ\text{C}$ per 15 giorni e fino a 30 giorni a temperatura intorno a $-20 ^\circ\text{C}$. 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).

E' 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 ed 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 $0,45 \mu\text{m}$ (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, seguendo scrupolosamente le norme di asepsi. Trasferire la membrana sul substrato di isolamento Agar Baird Parker (2.1.4.3.). Incubare a $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 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 utilizzare come controllo positivo *St. aureus* ATCC 6538 o *St. aureus* ATCC 25923 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in ogni caso, 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 $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per $(22 \div 26)$ ore. Eseguire tutte le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.1.5.4. 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 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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 sviluppata 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 ed 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.

2.1.5.7. 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 $(5 \div 15)$ 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.

2.1.6. Espressione dei risultati

Riportare il numero degli Stafilococchi patogeni come UFC/250 mL (Unità Formanti Colonia). 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 contaminate e già sottoposte a conferma, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 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 2

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 1).

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 $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ 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 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 $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ 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.

2.2.4.3. 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 $(2-8)$ °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).

E' 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 ed 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 ogni caso, 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 sviluppatasi sul substrato di isolamento (2.2.4.1.) isolandole su Agar Nutritivo (2.2.4.4.). Incubare a (36 ± 1) °C per $(22 \div 26)$ ore. Eseguire tutte le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.2.5.4. 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 sviluppata 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 ed 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 come UFC/250 mL (Unità Formanti Colonia). 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 come Unità Formanti Colonia per 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:

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

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

Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S., Wood W.B., McCarty M. "Trattato di Microbiologia", Piccin Editore, Padova; 1981. p. 836 - 849.

Floccia M. Stafilococchi patogeni nell'ambiente idrico. In: Pitagora Editrice Bologna (Ed.). Microbiologia delle acque potabili; 1989. p. 31-39.

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.

Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2002, n. 27. Modifiche ed 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.

Ottaviani M., Bonadonna L., Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano Vol. II Parte 2. Metodi microbiologici. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/14).

Sneath P.H.A.(Ed.) "Bergey's manual of systematic bacteriology". William and Wilkins Co., Baltimore, Md 1996 Vol. 2; p.1003 - 1019.