

**7000 - METODI PER LA
DETERMINAZIONE DI
MICROORGANISMI INDICATORI DI
INQUINAMENTO E DI PATOGENI**

7000. Metodi per la determinazione di microorganismi indicatori d'inquinamento e di patogeni

Dalla difficoltà di utilizzare tecniche di routine finalizzate alla ricerca di tutti i possibili organismi patogeni, è sorta la necessità di ricercare, per la definizione della qualità di un'acqua, microorganismi indicatori di contaminazione, la cui presenza può essere considerata indice della presenza di patogeni. L'uso degli indicatori tuttavia fornisce la probabilità, e non la certezza, della presenza di patogeni. I microorganismi storicamente proposti come indicatori di inquinamento fecale nell'ambiente e che vengono ricercati, comunemente e su base normativa, per la definizione della qualità di acque di diversa tipologia e a diversa destinazione d'uso sono i Coliformi Totali, i Coliformi Fecali (di cui fa parte *Escherichia coli*) e gli Streptococchi Fecali. Negli anni più recenti, l'approfondimento degli studi e delle ricerche ha tuttavia orientato l'interesse su altri gruppi di indicatori o specie microbiche più significativi: enterococchi ed *Escherichia coli* sono attualmente ritenuti più validi indicatori di contaminazione fecale e parametri che, meglio di altri, possono segnalare la eventuale presenza di patogeni. In Tab. 3 vengono suggeriti alcuni volumi iniziali per l'analisi di acque naturali di diversa tipologia per il rilevamento quantitativo degli indicatori di contaminazione fecale.

Tabella 3: Volumi proposti per l'analisi di acque di diversa tipologia per il rilevamento quantitativo degli indicatori di contaminazione fecale

Tipo di acqua	Volumi (mL)				
	10	1	0,1	0,01	0,001
Sorgente	x				
Lago	x	x			
Torrente		x	x		
Fiume		x	x		
Refluo					
clorata		x	x		
trattam. secondario		x	x	x	
trattam. primario			x	x	
grezza				x	x

La ricerca dei patogeni deve essere effettuata, rispetto agli indicatori, su quantitativi più elevati di acqua, ma, mentre il loro rilevamento testimonia ovviamente della loro sicura presenza, un risultato negativo non depone per la loro sicura assenza. Infatti i patogeni possono essere presenti con discontinuità negli effluenti e conseguentemente nei corpi idrici riceventi; in aggiunta, l'abbondante presenza di flora contaminante accessoria interferisce spesso con la reale possibilità di evidenziare i patogeni anche quando essi siano presenti. Pertanto, a causa della discontinuità della loro presenza e delle difficoltà tecniche legate al loro isolamento nell'ambiente idrico, la ricerca dei patogeni non potrà tanto avere il significato di controllare la qualità delle acque, quanto finalità epidemiologiche, offrendo la possibilità di individuare uno degli anelli della catena attraverso la quale avviene la diffusione degli agenti patogeni responsabili delle malattie infettive di origine idrica.

Di seguito vengono presentati i metodi di analisi per la ricerca sia di indicatori di contaminazione fecale (coliformi, streptococchi ed *Escherichia coli*) e di qualità (conteggio delle co-

lonie su agar), sia di alcuni organismi che producono forme di resistenza (spore di clostridi solfito-riduttori, uova di Elminti), di patogeni e opportunisti patogeni di natura batterica (*Salmonella*, *Vibrio* e *Aeromonas*), batteriofagi, virus e protozoi patogeni.

I metodi proposti per i diversi parametri microbiologici considerati sono stati elaborati in rispetto delle più recenti acquisizioni tecnico-scientifiche e degli aggiornamenti che in questi anni sono stati segnalati a livello nazionale ed internazionale. Sono pertanto stati inseriti metodi analitici che, sperimentati ampiamente in laboratorio e facenti parte di protocolli operativi per la ricerca dei parametri microbiologici presi in considerazione, erano già stati proposti da enti ed organizzazioni internazionali quali ISO, APHA, USEPA, AOAC, PHLS, WHO. Alcuni di essi fanno già parte di una serie di metodi di riferimento proposti a livello nazionale dall'Istituto Superiore di Sanità, dall'IRSA e dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Ancora, alcuni sono stati sottoposti a prove di comparazione tra metodi anche nell'ambito di circuiti interlaboratoriali svolti a livello europeo.

Per quanto riguarda le attrezzature di laboratorio, le tecniche di campionamento e quelle di analisi più generali, si fa riferimento alle Sezioni 6020, 6030 e 6040.

7010. Coliformi totali

1. Introduzione

1.1 Generalità

Nel gruppo dei coliformi totali vengono compresi microrganismi che fanno parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. L'appartenenza a questa famiglia da parte di generi differenti, 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. I coliformi totali sono batteri a forma di bastoncino, gram negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni. Sono considerati, insieme ai coliformi fecali e agli streptococchi, classici indicatori di contaminazione nelle acque. Pur essendo presenti nel materiale fecale di origine umana con una densità media di 10⁹ UFC/g, sono ubiquitari. Proprio a causa della loro costante presenza nell'ambiente, la loro validità come indicatori è stata più volte messa in dubbio. Le più recenti indicazioni, in fase comunque di ulteriore evoluzione, tendono a distinguere i microrganismi appartenenti al gruppo in due principali categorie che, in base alle specie, e non più al genere, differenziano coliformi di origine fecale e coliformi di origine acquatica e tellurica, naturalmente presenti nelle acque al di là di qualsiasi contaminazione. La prima categoria, ben conosciuta, è quella dei coliformi di riconosciuta origine fecale che comprende alcune specie dei generi *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, presenti nel materiale fecale dell'uomo e degli animali a sangue caldo e in acque e suoli contaminati. La seconda categoria corrisponde a specie che, al contrario, sono largamente distribuite nell'ambiente, dove possono anche moltiplicarsi, colonizzando suolo, acqua e vegetazione.

Nelle acque reflue grezze le loro concentrazioni possono raggiungere valori compresi tra 10⁷-10⁹ per 100 mL di campione.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione dei microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi totali.

1.3 Principio del metodo

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua.

Possono essere utilizzate due tecniche analitiche:

- *Metodo A*: metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, viene calcolata la densità dei coliformi totali in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta (Tab. 1, Sezione 6020). Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati, per la prova presuntiva, due terreni di coltura alternativi che si basano sulla fermentazione del lattosio.
- *Metodo B*: metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo per-

mette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato. Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati tre substrati alternativi.

1.4 *Campo di applicazione*

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

2. **METODO A. Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)**

Con questo metodo viene calcolata la densità dei coliformi totali in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri coliformi necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali. Il metodo è particolarmente adatto per l'esame di acque che presentano un'elevata torbidità.

2.1 *Volume da analizzare*

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

3. **Strumentazione e vetreria**

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. **Reattivi e terreni di coltura**

4.1 *Brodi per lo svolgimento della prova presuntiva*

4.1.1 Brodo Lattosato

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Peptone	5	g
Lattosio	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,9±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 e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

4.1.2 Brodo al Lauril Triptosio

Il terreno può essere utilizzato in alternativa al Brodo Lattosato (4.1.1). Si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

<i>Composizione:</i>		
Tryptosio	20	g
Lattosio	5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,75	g
Potassio diidrogeno fosfato	2,75	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio lauril solfato	0,1	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

4.2 Brodo per lo svolgimento della prova di conferma

4.2.1 Brodo Lattosato Bile Verde Brillante

<i>Composizione:</i>		
Peptone	10	g
Lattosio	10	g
Bile	20	g
Verde brillante	13,3	mg
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 e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno nei tubi contenenti la campanella di Durham rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

5. Procedura

5.1 Prova presuntiva

Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva (4.1.1 o 4.1.2), agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30 minuti. Incubare a 36±1°C. Dopo 24±2 ore agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas nella campanella ed eventualmente reincubare per altre 24 ore. Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas ed intorbidimento del brodo. La produzione di gas entro le 48±3 ore costituisce una reazione positiva presuntiva: sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

5.2 Prova di conferma

Prelevare, sterilmente, 0,1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo per la prova presuntiva (formazione di gas entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo lattosato bile verde brillante (4.2.1) per la prova di conferma. Incubare i tubi a 36±1°C per 24+24 ore. Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una reazione positiva per i coliformi totali.

Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la Tab. 1 (vedi Sezione 6020), calcolare, considerando l'eventuale diluizione, il valore dell'indice MPN.

6. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

7. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

8. METODO B. Metodo del numero più probabile (MPN)

Il metodo di seguito descritto viene riportato nel Manuale "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" sotto il nome di Enzyme Substrate Test. L'EPA ha approvato questo tipo di analisi sotto il nome di MMO-MUG test (Colilert). L'AOAC ha inserito il metodo analitico in "Official Methods of Analysis" con il nome di "Defined Substrate Technology" (Colilert).

Recentemente la performance del metodo è stata valutata, anche in Italia, durante lo svolgimento di un circuito interlaboratoriale di confronto tra metodi con la collaborazione di diversi laboratori europei.

È applicabile all'analisi di acque poco e mediamente contaminate, anche oligotrofe, clorate e comunque contenenti coliformi totali danneggiati. È di facile e rapido impiego.

8.1 Principio del metodo B

Il prodotto è già disponibile in commercio sotto forma di kit completo per l'inoculo del campione, utilizzabile in tubi e piastre multi-pozzetto, monouso, per lo svolgimento della tecnica del numero più probabile (MPN). Dopo un periodo di incubazione di 18 o 24 ore a $36\pm 1^\circ\text{C}$ si procede alla lettura dei risultati: i pozzetti positivi per la presenza di coliformi totali hanno virato al giallo. I risultati sono espressi come numero più probabile o Most Probable Number (MPN) per 100 mL di campione.

8.2 Volume da analizzare

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

8.3 Strumentazione e vetreria

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

- sigillatore automatico.

8.4 Reattivi e terreni di coltura

Composizione:		
Ammonio solfato	5	g
Manganese solfato	0,5	mg
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-metilumbellifenil-β-D-glucuronide	75	mg
Solanium	0,5	g
Hepes buffer		
Sali di sodio	5,3	g
Acido organico	6,9	g

8.4.1 Defined Substrate Technology (Colilert)

Il terreno disidratato viene distribuito in commercio in fiale già predosate per l'esame di 100 mL di campione o di una sua diluizione. Il kit fornisce la possibilità di leggere i risultati dopo 18 o 24 ore.

8.5 Procedura

Seguendo le istruzioni della ditta produttrice, mescolare in un flacone sterile il terreno disidratato (8.4.1) con 100 mL di campione o di una sua diluizione. Chiudere il flacone e mescolare per sciogliere completamente il terreno. Attendere che l'eventuale formazione di schiuma sia sparita e versare il contenuto del flacone nella piastra sterile a 51 pozzetti o in quella a 97 pozzetti. Sigillare la piastra inocolata con l'apposito sigillatore automatico (8.3) che provvede anche alla distribuzione del campione all'interno dei pozzetti.

8.5.1 Incubazione

Incubare a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ entrambi i tipi di piastre per un periodo di 18 ore per Colilert 18 e di 24 ore per Colilert.

8.5.2 Lettura e interpretazione dei risultati

I pozzetti che hanno virato al giallo sono considerati positivi per i coliformi totali. Senza diluizioni la piastra a 51 pozzetti permette la lettura da 1 a 200 microrganismi/100 mL; la piastra a 97 pozzetti permette la lettura da 1 a 2419 microrganismi/100 mL.

8.6 Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione. I valori dell'indice MPN sono calcolati in base alla tabella specifica fornita con il kit di analisi.

8.7 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

9. METODO C. Metodo della filtrazione su membrana (MF)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione dei coliformi totali che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche prodotte dai microrganismi ricercati. Di seguito vengono proposti tre substrati di isolamento alternativi.

9.1 Volume da analizzare

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

9.2 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

10. Reattivi e terreni di coltura

10.1. Terreni di isolamento

10.1.1 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 metodo che utilizza questo substrato è riportato nelle normative nazionali che richiedono la determinazione del parametro coliformi totali per la valutazione della qualità delle acque; pertanto viene necessariamente inserito tra i metodi proposti.

Nota: 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: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Non si sterilizza. Dopo avere sciolto la polvere in 1 L di acqua distillata contenente 20 mL di etanolo al 95%, si distribuisce in capsule di Petri. È preferibile pre-

parare il terreno al momento dell'uso e comunque, una volta preparato, mantenerlo al riparo dalla luce.

L'uso di questo substrato può comportare che coliformi danneggiati dai trattamenti che l'acqua ha subito non vengano rilevati e può permettere la crescita di microrganismi diversi da quelli ricercati. Pertanto può accadere che colonie rosse tipiche non siano formate da microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi totali, così come colonie atipiche possano originare da batteri coliformi. Pertanto, è consigliabile, qualora sorgano dubbi sulla natura delle colonie, sottoporre le colonie sospette a prove di conferma.

10.1.2 C-EC Agar

Composizione:		
Triptosio	10	g
Triptofano	1	g
Peptocomplesso	5	g
Estratto di lievito	3	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
IPTG	0,1	g
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside	0,08	g
4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide	0,05	g
Agar Bios LL	13	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. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 115±1°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

10.1.3 Chromogenic E.coli/Coliform Medium

Composizione:		
Miscela cromogenica	20,3	g
Estratto di lievito	3	g
Peptone	5	g
Lattosio	2,5	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio fosfato monoacido	3,5	g
Potassio fosfato biacido	1,5	g
Rosso neutro	0,03	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. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

Il terreno è adatto per la determinazione dei coliformi totali in acque con basse densità di microrganismi interferenti.

10.2 Substrato di crescita

10.2.1 Agar soia triptone

<i>Composizione:</i>		
Tryptone	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 $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa $+4^{\circ}\text{C}$ per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

10.3 Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

10.3.1 Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

<i>Composizione:</i>		
N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uso sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso.

Nota: è da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.

11. Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di $0,45\ \mu\text{m}$ di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

11.1 Lettura dei risultati

Dopo incubazione, sul terreno m-Endo Agar (Les) (10.1.1) la lettura dei risultati deve essere effettuata al più presto allo scopo di evitare che la luce provochi alterazioni cromatiche delle colonie cresciute.

Sono da considerare coliformi totali le colonie cresciute entro le 24 ore, di colore rosso con riflesso verde metallico.

Sul C-EC Agar (10.1.2) sono considerate coliformi totali le colonie di colore verde-blu cresciute entro le 24 ± 2 ore.

Sul substrato Chromogenic *E. coli*/Coliform Medium (10.1.3) sono considerate coliformi totali le colonie di colore rosa cresciute entro le 24 ± 2 ore.

È possibile procedere, per la verifica dell'appartenenza alla famiglia delle Enterobacteriacee, a cui il gruppo dei coliformi totali appartiene, alla prova della citocromossidasi (12.1), quale prova di conferma. Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica seguendo le indicazioni della ditta produttrice.

12. Conferma biochimica

12.1 Prova della citocromossidasi

Prima di effettuare la prova è necessario selezionare, isolando per striscio, le colonie sospette su Agar soia triptone (10.2.1) ed incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore.

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

13. Procedura

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno di crescita e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (10.3.1) 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 totali) si manifesta con il mancato sviluppo di colore, mentre i microrganismi ossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.

14. Espressione dei risultati

Il numero di coliformi totali isolati si calcola in base al numero di colonie contate, ed eventualmente sottoposte a conferma, considerando la eventuale diluizione e riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 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 seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \quad (1)$$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

A = numero di colonie confermate;

B = numero di colonie da sottoporre a conferma;

N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;

V_t = volume (mL) di campione analizzato;

V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);

F = fattore di diluizione.

15. Resoconto di prova

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

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for examination of water and wastewater", XX Ed., (Washington, APHA).

BONADONNA L. (1994): "Coliformi totali sul substrato mEndo: un parametro critico nella routine delle analisi microbiologiche", *Tecnica Sanitaria*, **32**, 151-159.

HAVELAAR A.H., HEISTERKAMP S.H., HOEKSTRA J.A. & MOOIJMAN K.A. (1993): "Performance characteristics of methods for the bacteriological examination of water", *Wat. Sci. Technol. "Technol."*, **97**, 1-13.

7020. Coliformi fecali

1. Introduzione

1.1 Generalità

I coliformi fecali o termotolleranti fanno parte di quella frazione di microrganismi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae, a forma di bastoncino, gram-negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni che, in base alla definizione basata sulla tecnica della fermentazione, fermentano il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di $44 \pm 1^\circ\text{C}$ in 24 ore. Sono presenti nel materiale fecale ad una concentrazione media di 10^7 - 10^8 UFC/g e possono trovarsi nelle acque reflue grezze a una concentrazione intorno a 10^5 - 10^7 UFC/100 mL. La loro presenza costituisce un indice di contaminazione fecale dell'acqua esaminata.

I metodi classici per il loro rilevamento utilizzano una temperatura più elevata come fattore discriminante per distinguerli dai membri del gruppo dei coliformi di origine non fecale.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione dei microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi fecali.

1.3 Principio del metodo

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua.

Possono essere utilizzate due tecniche analitiche:

- *Metodo A*: metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, viene calcolata la densità dei coliformi fecali in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione in terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta (Tab. 1, Sezione 6020). Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati, per la prova presuntiva, due terreni di coltura alternativi che si basano sulla fermentazione del lattosio.
- *Metodo B*: metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato. Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento dei coliformi fecali che garantiscono buoni risultati in fase analitica, anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutte le specie presenti. È necessario in ogni caso tenere in considerazione che la scelta di un substrato o di un altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore, a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività. Di seguito vengono proposti due substrati alternativi.

1.4 Campo di applicazione

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

2. METODO A. Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità dei coliformi fecali in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri coliformi necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali. Il metodo è particolarmente adatto per l'esame di acque che presentano un'elevata torbidità.

2.1 Volume da analizzare

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

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. Reattivi e terreni di coltura

4.1 Brodi per lo svolgimento della prova presuntiva

4.1.1 Brodo Lattosato

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Peptone	5	g
Lattosio	5	g
Acqua distillata pH 6,9±0,2	1000	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 e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

4.1.2 Brodo al Lauril Triptosio

Composizione:

Triptosio	20	g
Lattosio	5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,75	g
Potassio diidrogeno fosfato	2,75	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio lauril solfato	0,1	g
Acqua distillata pH 6,8±0,2	1000	mL

Il terreno può essere utilizzato in alternativa al Brodo Lattosato (4.1.1). Si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

4.2 Brodo per lo svolgimento della prova di conferma

4.2.1 EC Medium

Composizione:		
Triptosio	20	g
Lattosio	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	4	g
Potassio diidrogeno fosfato	1,5	g
Sodio cloruro	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,9±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 e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

5. Procedura

5.1 Prova presuntiva

Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva (4.1.1 o 4.1.2), agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30 minuti. Incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$. Dopo 24 ± 2 ore agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas nella campanella ed eventualmente reincubare per altre 24 ore. Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas ed intorbidimento del brodo. La produzione di gas entro le 48 ± 3 ore costituisce una reazione positiva presuntiva, sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

5.2 Prova di conferma

Prelevare, sterilmente, 0,1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo per la prova presuntiva (formazione di gas entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il brodo per la prova di conferma (4.2.1). Incubare i tubi a $44\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore. Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una reazione positiva per i coliformi fecali.

Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la Tab. 1 (vedi Sezione 6020), calcolare, considerando l'eventuale diluizione, il valore dell'indice MPN.

6. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

7. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

8. METODO B. Metodo della filtrazione su membrana (MF)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione dei coliformi fecali che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche prodotte dai microrganismi ricercati. Di seguito sono proposti due substrati d'isolamento alternativi.

8.1 Volume da analizzare

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

9. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

10. Reattivi e terreni di coltura

10.1 Terreni di isolamento

10.1.1 m-FC Agar

Composizione:

Triptosio	10	g
Proteose peptone n. 3 o polipeptone	5	g
Estratto di lievito	3	g
Sodio cloruro	5	g
Lattosio	12,5	g
Sali di bile	1,5	g
Blu di anilina	0,1	g
Agar	15	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 in acqua distillata contenente 10 mL di acido rosolico all'1% in NaOH 0,2 N. Non sterilizzare. Conservare il terreno distribuito in capsule Petri a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

10.1.2 C-EC Agar

Composizione:		
Triptosio	10	g
Triptofano	1	g
Peptocomplesso	5	g
Estratto di lievito	3	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
IPTG	0,1	g
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside	0,08	g
4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide	0,05	g
Agar Bios LL	13	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. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 115±1°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

10.2 Substrato di crescita

10.2.1 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±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

10.3 Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

10.3.1 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.

Nota: è da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.

11. Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 44±1°C per 18-24 ore.

11.1 Lettura dei risultati

Sul terreno m-FC (10.1.1) i coliformi fecali crescono come colonie blu, ma possono presentare diverse sfumature del colore. Alcuni *Escherichia coli* possono formare colonie atipiche di colore giallo chiaro. Colonie di colore grigio-crema sono formate generalmente da coliformi non fecali.

Sul C-EC Agar (10.1.2) gli stessi microrganismi sviluppano colonie di colore verde-blu.

È possibile procedere, per la verifica dell'appartenenza alla famiglia delle Enterobatteriacee, a cui il gruppo dei coliformi fecali appartiene, alla prova della citocromossidasi (12.1), quale prova di conferma. Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica seguendo le indicazioni della ditta produttrice.

12. Conferma biochimica

12.1 Prova della citocromossidasi

Prima di effettuare la prova è necessario selezionare, isolando per striscio, le colonie sospette su Agar soia triptone (10.2.1) ed incubare a 36±1°C per 24±2 ore.

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

13. Procedura

Prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno di crescita e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (10.3.1) 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 fecali) si manifesta con il mancato sviluppo di colore, mentre i microrganismi ossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.

14. Espressione dei risultati

Il numero di coliformi fecali isolati si calcola in base al numero di colonie contate, ed eventualmente sottoposte alla prova di conferma, considerando l'eventuale diluizione e riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 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 seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \quad (1)$$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

A = numero di colonie confermate;

B = numero di colonie da sottoporre a conferma;

N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;
 V_1 = volume (mL) di campione analizzato;
 V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);
F = fattore di diluizione.

15. Resoconto di prova

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

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for examination of water and wastewater", XX Ed., (Washington, APHA).

GELDREICH E.E., CLARK H.F., HUFF C.B. & BEST L.C. (1965): "Fecal coliform organism medium for the membrane filter technique", *J. Am. Water Works Ass.*, **57**, 208.

7030. *Escherichia coli*

1. Introduzione

1.1 Generalità

Mentre le denominazioni "coliformi totali" e "coliformi fecali" fanno riferimento a gruppi eterogenei di batteri, il termine *Escherichia coli* corrisponde ad una specie tassonomicamente definita, a sua volta compresa nella famiglia delle Enterobacteriaceae. *Escherichia coli* è un microrganismo a forma di bastoncello gram-negativo, aerobio ed anaerobio facoltativo, non sporigeno, che cresce alla temperatura di $44 \pm 1^\circ\text{C}$, lattosio-fermentante, indolo-positivo in terreni contenenti triptofano, β -D-glucuronidasi-positivo. In letteratura, la presenza di questo enzima è stata evidenziata nel 94-99,5 dei biotipi di *Escherichia coli*, con l'eccezione dei sierotipi O157:H7, e anche, in bassa percentuale, in *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia*. L'enzima non è prodotto dai coliformi; conseguentemente il rilevamento della sua presenza può essere usato per discriminare *Escherichia coli* da questi ultimi.

Per talune peculiari caratteristiche *Escherichia coli* sembra meglio soddisfare i requisiti insiti nella definizione di organismo indicatore, rispetto ai tradizionali indicatori di contaminazione fecale delle acque e già da tempo l'Organizzazione Mondiale della Sanità considera questa specie come indicatore primario di inquinamento di origine fecale. Tale scelta è motivata dalla maggiore stabilità della sua presenza nell'ambiente acquatico nel corso dell'anno rispetto ai coliformi, che risulterebbero più sensibili alle variazioni stagionali e, non di meno, dalla minore sensibilità del microrganismo alle procedure di disinfezione rispetto alla maggior parte dei patogeni enterici. Inoltre 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.

Con i metodi tradizionali, che ne consentono una diagnosi solamente presuntiva, la determinazione analitica di *Escherichia coli* ha necessariamente sempre comportato lo svolgimento di una serie di prove di conferma. Più di recente sono stati formulati substrati diversi da quelli tradizionali, modificati con l'aggiunta di composti cromogeni e fluorogeni che si basano sullo sfruttamento di attività enzimatiche specifiche. I dati, riportati in letteratura anche da altri autori e ricavati da esperienze di laboratorio svolte anche nell'ambito di circuiti interlaboratoriali europei, confermano la possibilità di evidenziare, con questi substrati, in modo selettivo, direttamente la specie ricercata, con rese equivalenti o superiori rispetto ai terreni convenzionali.

1.2 Obiettivo

I metodi descritti consentono di valutare, in un determinato volume di acqua, la concentrazione di *Escherichia coli* mediante il calcolo statistico del Most Probable Number (MPN, numero più probabile) o con procedure di conta diretta.

1.3 Principio dei metodi

Di seguito sono proposti diversi metodi per il rilevamento di *Escherichia coli* (Metodi A-F), tutti basati, non più sulla tradizionale reazione della fermentazione del lattosio, bensì sul rilevamento dell'attività enzimatica della β -glucuronidasi, evidenziabile dall'idrolisi di β -glucuronidi cromogeni o fluorogeni, con rilascio di composti colorati o fluorescenti.

1.4 - Campo di applicazione

Le procedure analitiche di seguito riportate possono essere utilizzate per l'analisi di acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. METODO A

Il metodo di seguito descritto corrisponde alla Norma ISO 9308-3: 1998. È applicabile all'analisi di tutti i tipi di acque superficiali e reflue, ed è particolarmente adatto all'esame di quelle ricche di materiale in sospensione. È di facile e rapido impiego.

2.1 Principio del Metodo A

Il campione diluito è inoculato in 96 pozzetti da 350 μ L contenenti il terreno di coltura disidratato. Dopo un periodo di incubazione di 36-72 ore a $44\pm 1^\circ\text{C}$ si procede alla lettura dei risultati sotto lampada a ultravioletti (366 nm). *Escherichia coli*, idrolizzando il 4-metilumbeliferil- β -D-glucuronide (MUG), produce fluorescenza blu nei pozzetti. I risultati sono espressi come numero più probabile o Most Probable Number (MPN) per 100 mL di campione.

2.2 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare le diluizioni da inoculare in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare.

In Tab. 1, per l'analisi di diverse tipologie di acque, vengono riportati il numero di diluizioni in funzione del livello di contaminazione presunto.

2.3 Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, dalla preparazione del terreno colturale alla lettura dei risultati, oltre alla normale attrezzatura di laboratorio sono necessari:

- essiccatore;
- lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm;
- micropipetta a 8 canali per l'inoculo di 200 μ L;
- nastro adesivo sterile;
- piastre Petri;
- piastre sterili a 96 pozzetti da 350 μ L, non fluorescenti e a fondo piatto;
- puntali sterili per micropipetta;
- tubi per diluizioni.

Tabella 1: Esempi di diluizione in funzione del livello di contaminazione delle acque

Tipo di acqua	N° di diluizioni	N° di pozzetti/diluizione		Valori limite di misura N° batteri/100 mL
Superficiale marina	2	64	a 1:2	15-3,5 \cdot 10 ⁴
		32	a 1:20	
		24	a 1:2	
		24	a 1:20	
Superficiale dolce	4	24	a 1:200	40-3,2 \cdot 10 ⁶
		24	a 1:2000	
Reflua grezza e trattata	6	16	a 1:2	60-6,7 \cdot 10 ⁸
		oltre 16	a 1:200000	

2.4 Reattivi e terreni di coltura

2.4.1 MUG/EC Medium

Composizione:		
Tryptone	40	g
Salicina	1	g
Triton X 100	1	g
MUG	100	mg
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno si trova in commercio disidratato e pronto per l'uso, già distribuito in piastre a 96 pozzetti corredate di nastro adesivo. Per la procedura di analisi, seguire le istruzioni della ditta produttrice.

Qualora si proceda alla sua preparazione, a 1 L di acqua distillata aggiungere triptone, salicina e Triton (il Triton X 100 è uno dei prodotti utilizzabili, disponibili in commercio; possono comunque essere utilizzati prodotti equivalenti purché sia dimostrato forniscano gli stessi risultati), mantenendo in agitazione fino ad ebollizione e completa dissoluzione degli ingredienti. Raffreddare ed aggiungere il MUG disciolto in 2 mL di N,N-dimetilformamide. Aggiustare il pH a $6,9 \pm 0,2$.

Sterilizzare per filtrazione attraverso membrane con porosità nominale di $0,2 \mu\text{m}$. Distribuire in aliquote da 100 μL in ciascuno dei 96 pozzetti in piastra. Disidratare immediatamente in un essiccatore o sotto cappa a flusso laminare.

Nota: la N,N-dimetilformamide è tossica. Il prodotto può causare il cancro ed è nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione: protezione respiratoria (mascherina antipolvere e uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

2.4.2 Soluzione diluente

Composizione:		
Acqua di mare sintetica	22,5	g
Soluzione di blu di bromofenolo	10	mL
Acqua distillata	1000	mL

Miscelare gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15-20 minuti. Preparare la soluzione di blu di bromofenolo aggiungendo 0,04 g a 100 mL di etanolo al 50%. L'aggiunta di questa soluzione è facoltativa e utile solo per la colorazione della soluzione diluente.

In alternativa alla soluzione diluente sopra indicata, possono essere utilizzati altri diluenti, quali acqua distillata, a meno che le stesse diluizioni preparate per il conteggio di *Escherichia coli* non debbano essere usate per il conteggio degli enterococchi intestinali.

2.4.3 Acqua distillata

Utilizzare acqua distillata priva di sostanze inibenti la crescita nelle condizioni di prova. Sterilizzare l'acqua distillata a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15-20 minuti.

2.5 Procedura

2.5.1 Preparazione delle diluizioni

2.5.1.1 Acque con salinità <30‰

Aggiungere 9 mL di soluzione diluente (2.4.2) in tutti i tubi preparati in base al numero delle diluizioni prescelte. Agitare il campione per ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi e, usando una pipetta sterile, trasferire 9 mL del campione nel primo tubo contenente 9 mL di soluzione diluente (diluizione 1:2). Usando una nuova pipetta, dopo miscelazione, trasferire 1 mL della prima diluizione al secondo tubo (diluizione 1:20) e procedere allo stesso modo per le diluizioni successive.

2.5.1.2 Acque con salinità ≥30‰

Aggiungere 9 mL di acqua distillata sterile (2.4.3) nel tubo della prima diluizione e 9 mL di soluzione diluente (2.4.2) a tutti i tubi successivi preparati in base al numero delle diluizioni prescelte. Agitare il campione per ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi e, usando una pipetta sterile, trasferire 9 mL del campione nel primo tubo contenente 9 mL di acqua distillata (diluizione 1:2). Usando una nuova pipetta, dopo miscelazione, trasferire 1 mL della prima diluizione al secondo tubo (diluizione 1:20) e procedere allo stesso modo per le diluizioni successive.

2.5.2 Semina delle diluizioni e incubazione

Con le adeguate regole di asepsi, versare la diluizione iniziale in una piastra Petri vuota sterile e, usando una micropipetta a 8 canali, distribuire 200 µL in ciascun pozzetto contenente il terreno disidratato (2.4.1), corrispondente alla prima diluizione. Operare in modo analogo per le diluizioni successive, cambiando la piastra Petri e i puntali ad ogni diversa diluizione. Coprire la piastra di inoculo con nastro adesivo sterile per prevenire contaminazioni esterne e disidratazione dell'inoculo.

Incubare le piastre inoculate a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ per almeno 36 ore e fino ad un massimo di 72 ore.

2.5.3 Lettura dei risultati

I pozzetti che sotto luce ultravioletta risultano blu-fluorescenti sono considerati positivi.

2.6 Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

Se nessuno dei pozzetti è positivo, esprimere il risultato come $<n/100$ mL, dove n è il valore dell'indice MPN per 1 pozzetto positivo nelle condizioni di diluizioni impiegate.

Per il calcolo dell'indice MPN procedere determinando il numero caratteristico in base al numero di pozzetti positivi per ciascuna diluizione selezionata, che, con più di 3 diluizioni, dovrà corrispondere ad un numero composto da 3 cifre. Individuato il numero caratteristico, per calcolare il valore dell'MPN consultare la norma NF T 90-433: agosto 1997, ovvero consultare le tabelle fornite con il terreno colturale.

2.7 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

3. METODO B

Il metodo di seguito descritto viene riportato nel Manuale "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" sotto il nome di Enzyme Substrate Test. L'EPA ha approvato questo tipo di analisi, e le successive modifiche (possibilità di quantificare la concentrazione di

Escherichia coli tramite la tecnica dell'MPN), sotto il nome di MMO-MUG test (Colilert). L'AOAC ha inserito il metodo analitico in "Official Methods of Analysis" con il nome di "Defined Substrate Technology" (Colilert).

Recentemente la performance del metodo è stata valutata, anche in Italia, durante lo svolgimento di un circuito interlaboratoriale di confronto tra metodi con la collaborazione di diversi laboratori europei.

È applicabile all'analisi di acque poco e mediamente contaminate, anche oligotrofe, clorate e comunque contenenti *Escherichia coli* danneggiati. È di facile e rapido impiego.

3.1 Principio del metodo B

Il prodotto è già disponibile in commercio sotto forma di kit completo per l'inoculo del campione, utilizzabile in tubi e piastre multi-pozzetto, monouso, per lo svolgimento della tecnica del numero più probabile (MPN). Dopo un periodo di incubazione di 18 o 24 ore a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ si procede alla lettura dei risultati sotto lampada a ultravioletti (366 nm). *Escherichia coli*, idrolizzando il 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUG), produce fluorescenza nei pozzetti. I risultati sono espressi come numero più probabile o Most Probable Number (MPN) per 100 mL di campione.

3.2 Volume da analizzare

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

3.3 Strumentazione e vetreria

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

- lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm;
- sigillatore automatico.

3.4 Reattivi e terreni di coltura

3.4.1 Defined Substrate Technology (Colilert)

Composizione:

Ammonio solfato	5	g
Manganese solfato	0,5	mg
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 disidratato viene distribuito in commercio in fiale già predosate per l'esame di 100 mL di campione o di una sua diluizione. Il kit fornisce la possibilità di leggere i risultati dopo 18 o 24 ore.

3.5 Procedura

Seguendo le istruzioni della ditta produttrice, mescolare, in un flacone sterile, il terreno disidratato (3.4.1) con 100 mL di campione o di una sua diluizione. Chiudere il flacone e mescolare per sciogliere completamente il terreno. Attendere che l'eventuale formazione di schiuma sia sparita e versare il contenuto del flacone nella piastra sterile a 51 pozzetti o in quella a 97 pozzetti. Sigillare la piastra inocolata con l'apposito sigillatore automatico (3.3) che provvede anche alla distribuzione del campione all'interno dei pozzetti.

3.5.1 Incubazione

Incubare a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ entrambi i tipi di piastre per un periodo di 18 ore per Colilert 18 e di 24 ore per Colilert.

3.5.2 Lettura e interpretazione dei risultati

I pozzetti che sotto luce ultravioletta risultano fluorescenti sono considerati positivi per *Escherichia coli*. Senza diluizioni la piastra a 51 pozzetti permette la lettura da 1 a 200 microrganismi/100 mL; la piastra a 97 pozzetti permette la lettura da 1 a 2419 microrganismi/100 mL.

3.6 Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione. I valori dell'indice MPN sono calcolati in base alla tabella specifica fornita con il kit di analisi.

3.7 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

4. METODO C

Questo metodo permette di contare il numero delle colonie di *Escherichia coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene. In presenza di elevate concentrazioni di *Escherichia coli* nel campione, la lettura dei risultati può rivelarsi complicata dalla diffusione e confluenza della fluorescenza prodotta dalle colonie tipiche. Pertanto il metodo risulta più idoneo all'analisi di acque trattate e comunque poco contaminate.

4.1 Principio del metodo C

Un'aliquota del campione o una sua diluizione sono filtrati attraverso una membrana di esteri di cellulosa di $0,45\ \mu\text{m}$ di porosità nominale. Dopo un periodo di incubazione di 18-24 ore a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ si procede alla lettura dei risultati sotto lampada a ultravioletti (366 nm). Il composto 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUG), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla β -glucuronidasi di *Escherichia coli*, rilasciando il composto 4-metilumbelliferone che produce quindi colonie di colore blu-verde, fluorescenti alla luce ultravioletta. I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 mL di campione.

4.2 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'ac-

qua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

4.3 Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio è necessaria la lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm.

4.4 Reattivi e terreni di coltura

4.4.1 C-EC Agar

Composizione:

Triptosio	10	g
Triptofano	1	g
Peptocomplesso	5	g
Estratto di lievito	3	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
IPTG	0,1	g
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside	0,08	g
4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide	0,05	g
Agar Bios LL	13	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. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 115±1°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

Il terreno è adatto per l'analisi di acque con basse concentrazioni di *Escherichia coli*.

4.5 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 μm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento (4.4.1) e procedere all'incubazione a 44±1°C per 18-24 ore.

4.5.1 Lettura e interpretazione dei risultati

Escherichia coli sviluppa colonie tipiche di colore verde-blu che risultano fluorescenti alla luce ultravioletta. Le colonie atipiche crescono di colore biancastro o incolore.

4.6 Espressione dei risultati

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

4.7 Resoconto di prova

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

5. METODO D

Questo metodo permette di contare il numero delle colonie di *Escherichia coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene. Il metodo risulta idoneo all'analisi di acque reflue e superficiali.

5.1 Principio del metodo D

Un'aliquota del campione o una sua diluizione sono filtrati attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 0,45 µm di porosità nominale. Dopo un periodo di incubazione di 18-24 ore a 44±1°C si procede alla lettura dei risultati. Il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-glucuronide (X-Gluc), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla β-glucuronidasi di *Escherichia coli* che produce quindi colonie di colore blu-verde. I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 mL di campione.

5.2 Volume da analizzare

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

5.3 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

5.4 Reattivi e terreni di coltura

5.4.1 Chromogenic E. coli Agar

Composizione:		
Triptone	20	g
Triptofano	1	g
Estratto di lievito	5	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
Sodio fosfato bibasico	5	g
Potassio fosfato monobasico	1,5	g
X-Gluc	0,06	g
Agar	12	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±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±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

5.5 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento (5.4.1) e procedere all'incubazione a 44±1°C per 18-24 ore.

5.5.1 Lettura e interpretazione dei risultati

Escherichia coli sviluppa colonie tipiche di colore verde-blu. Le colonie atipiche crescono incolore.

5.6 *Espressione dei risultati*

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

5.7 *Resoconto di prova*

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

6. METODO E

Questo metodo permette di contare il numero delle colonie di *Escherichia coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene. Il metodo risulta idoneo all'analisi di acque trattate e comunque contenenti *Escherichia coli* danneggiati.

6.1 *Principio del metodo E*

Un'aliquota del campione o una sua diluizione sono filtrati attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 0,45 µm di porosità nominale. Dopo un periodo di incubazione di 18-24 ore a 36±1°C si procede alla lettura dei risultati. Il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-glucuronide (X-Gluc), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla β-glucuronidasi di *Escherichia coli* che produce quindi colonie di colore grigio-blu. I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 mL di campione.

6.2 *Volume da analizzare*

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

6.3 *Strumentazione e vetreria*

Normale attrezzatura di laboratorio.

6.4 *Reattivi e terreni di coltura*

6.4.1 Chromogenic Coliform Agar

Composizione:

Triptosio	10	g
Triptofano	0,1	g
Estratto di lievito	3	g
Peptocomplex	5	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
IPTG	0,1	g
X-Gluc	0,06	g
Salmon Gal	0,15	g
Agar	13	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±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 $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa $+4^{\circ}\text{C}$ per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

6.5 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di $0,45\ \mu\text{m}$ di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento (6.4.1) e procedere all'incubazione a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

6.5.1 Lettura e interpretazione dei risultati

Escherichia coli sviluppa colonie tipiche di colore grigio-blu. Le colonie di coliformi crescono di colore salmone e le colonie atipiche incolori.

6.6 Espressione dei risultati

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

6.7 Resoconto di prova

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

7. METODO F

Il metodo di seguito descritto è stato prodotto su indicazione del Public Health Laboratory Service (PHLS) e contiene il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-glucuronide (BCIG). La "performance" del metodo è stata valutata, anche in Italia, durante lo svolgimento di un circuito interlaboratoriale di confronto tra metodi con la collaborazione di diversi laboratori europei.

Il metodo permette di contare il numero delle colonie di *Escherichia coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene.

Il metodo risulta particolarmente idoneo all'analisi di acque superficiali dolci o marine e di acque reflue.

7.1 Principio del metodo F

Un'aliquota del campione o una sua diluizione è filtrata attraverso la membrana di esteri di cellulosa con pori di $0,45\ \mu\text{m}$. Dopo un periodo d'incubazione di 18-24 ore a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ si procede alla lettura dei risultati. Il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-glucuronide (X-Gluc), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla β -glucuronidasi di *Escherichia coli*, che produce quindi colonie di colore blu-verde.

I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 mL di campione.

7.2 Volume da analizzare

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

7.3 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

7.4 Reattivi e terreni di coltura

7.4.1 Tryptone Bile X-Glucuronide Agar

Composizione:		
Tryptone	20	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
X-Gluc	0,075	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. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa $+4^{\circ}\text{C}$ per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

7.5 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con pori di $0,45\ \mu\text{m}$ di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento (7.4.1) e procedere all'incubazione a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

7.5.1 Lettura e interpretazione dei risultati

Escherichia coli sviluppa colonie tipiche di colore verde-blu.

7.6 Espressione dei risultati

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

7.7 Resoconto di prova

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

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 9223 B Enzyme Substrate Test, XX Ed., (Washington, APHA).

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1995): "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists; AOAC Official Method 991. 15. Total coliforms and *Escherichia coli* in water, Defined Substrate Technology (Colilert) Method, 16th Edition, AOAC International, Arlington, Vi.

BONADONNA L. & VOLTERRA L. (1992): "Un metodo rapido per l'analisi microbiologica dell'acqua: il test Autoanalysis Colilert", *Biologi italiani*, **10**, 14-17.

BONADONNA L. & VILLA L. (1993): "Un substrato cromogeno per l'isolamento dei coliformi totali nelle acque: il C-EC-MF", *IRSA-Notiziario Metodi Analitici per le Acque*, **13**, 3-7.

BONADONNA L., CHIARETTI G., COCCIA A.M. & SEMPRONI M. (1997): "Valutazione comparativa di procedure analitiche per il rilevamento di Enterobacteriaceae in acque marine costiere", *Rapporti ISTISAN 97/3*, pp. 42.

BRIANCESCO R., COCCIA A.M., DELLA LIBERA S., SEMPRONI M. & BONADONNA L. (2000): "Nuovi orientamenti normativi per il controllo delle acque: la ricerca di *Escherichia coli*", *Igiene e Sanità Pubblica*, **LVI**, 85-94.

HERNANDEZ J.F., GUIBERT J.M., DELATTRE J.M., OGER C., CHARRIERE C., HUGHES B., SERCEAU R. & SINEGRE F. (1991): "Miniaturized fluorogenic assays for enumeration of *E. coli* and enterococci in marine water", *Wat. Sci. and Technol.*, **24**, 137-141.

ISO (1998): "Water quality - Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water. Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium", *ISO Cont. 06/ 09308-03*.

KILIAN M. & BULOW P. (1976): "Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae I. Detection of bacterial glycosidases", *Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica* (section B), **84**, 245-251.

PHLS, Public Health Laboratory Service (1994): "The microbiology of water. Methods for the examination of waters and associated materials", Report No. 71, Her Majesty's Stationary Office, London.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1994): "Federal Register - National Primary and Secondary Drinking Water Regulations: Analytical Methods for regulated drinking water contaminant", Final Rule. Part V, 40 CFR Part 141-143. *Federal Register* **59**, 62456.

WALTER K.S., FRICKER E.J. & FRICKER C. R. (1994): "Observation on the use of a medium detecting β -glucuronidase activity and lactose fermentation for the simultaneous detection of *E. coli* and coliforms", *Letters in Applied Microbiology*, **19**, 47-49.

WHO, World Health Organization (1993): "Guidelines for drinking water quality", 2nd Edition, Ginevra.

7040. Streptococchi fecali ed enterococchi

1 Introduzione

1.1 Generalità

Il gruppo degli Streptococchi fecali è stato considerato per lungo tempo efficace indicatore di contaminazione fecale per gli ecosistemi acquatici. Sebbene alcuni autori considerino i termini streptococchi fecali, enterococchi, enterococchi intestinali e gruppo *Enterococcus* sinonimi nel caso delle specie rilevabili nell'ambiente, l'ordinamento tassonomico del gruppo, negli ultimi anni, è stato oggetto di ampia revisione. Con il termine Streptococchi fecali è stato indicato un gruppo di microrganismi eterogeneo sia dal punto di vista tassonomico sia ecologico, raggruppati insieme sulla base della morfologia microscopica, della reattività alla colorazione di Gram e della assenza dell'enzima catalasi. Gli studi più recenti hanno distinto invece, 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 origine fecale. Attualmente il genere *Enterococcus* 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* soddisfano specifici requisiti: crescita a 10°C e 45°C, resistenza a 60°C per 30 minuti, crescita a pH 9,6 e a 6,5% di NaCl, idrolisi del 4-metilumbelliferil-β-D-glucoside (MUD) in presenza di tallio acetato, acido nalidixico e 2,3,5- trifeniltetrazolio cloruro (TTC). I gruppi individuati in questo genere comprendono *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 di specie diverse al genere *Enterococcus*, 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 più ampio degli streptococchi, l'idrolisi dell'esculina, se ancora utile ad individuare anche le nuove specie del genere *Enterococcus*, fornisce comunque reazione positiva anche per *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* e *Leuconostoc*.

Era stata precedentemente valutata la possibilità che la proporzione tra numero di streptococchi fecali e di coliformi fecali potesse dare una indicazione sulla origine fecale dell'inquinamento. Con un rapporto ≥ 4 la contaminazione si considerava presumibilmente di derivazione umana, mentre era considerata diversa (animale) se il rapporto fosse stato $\leq 0,7$. Tuttavia il valore di questa proporzione è stato messo in discussione a causa della diversa capacità di sopravvivenza da parte dei microrganismi considerati. Inoltre, la maggiore resistenza all'azione dei disinfettanti da parte dei microrganismi del gruppo, alterando la proporzione numerica tra le due categorie di indicatori (streptococchi e coliformi), può essere causa di erronee interpretazioni. Pertanto il calcolo del rapporto tra i due indicatori di inquinamento fecale non dovrebbe avere validità per caratterizzare l'origine della contaminazione.

Nelle acque reflue le concentrazioni degli streptococchi fecali in 100 mL sono comprese generalmente tra 10^4 - 10^6 .

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione dei microrganismi appartenenti al gruppo degli streptococchi/enterococchi.

1.3 *Principio del metodo*

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua.

Possono essere utilizzate le seguenti tecniche analitiche:

- *Metodo A*: metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, è calcolata la densità degli streptococchi/enterococchi in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione in terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta (Tab.1, Sezione 6020).
- *Metodo B*: metodo del numero più probabile (Most Probable Number, MPN) in micropiastre a 96 pozzetti, basato sul rilevamento dell'attività enzimatica della β -glucosidasi, evidenziabile dall'idrolisi di un β -glucoside, con rilascio di composti colorati e fluorescenti. Il campione diluito è inoculato in 96 pozzetti da 350 μ L contenenti il terreno di coltura disidratato. Dopo un periodo di incubazione di 36-72 ore a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ si procede alla lettura dei risultati sotto lampada di Wood (366 nm). L'idrolisi del 4-metilumbelliferil- β -D-glucoside (MUD) produce fluorescenza blu nei pozzetti.
- *Metodo C*: metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato. Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento degli streptococchi/enterococchi che garantiscono buoni risultati in fase analitica, anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutte le specie presenti. È necessario in ogni caso tenere in considerazione che la scelta di un substrato o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività.

1.4 *Campo di applicazione*

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

2. **METODO A. Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)**

Con questo metodo è calcolata la densità degli streptococchi/enterococchi in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali. Il metodo è particolarmente adatto per l'esame di acque che presentano un'elevata torbidità.

2.1 *Volume da analizzare*

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

2.2 *Strumentazione e vetreria*

Normale attrezzatura di laboratorio.

2.3 Reattivi e terreni di coltura

2.3.1 Brodi per lo svolgimento della prova presuntiva

2.3.1.1 Brodo all'Azide Destrosio

Composizione:		
Estratto di carne	4,5	g
Triptone	15	g
Glucosio	7,5	g
Sodio cloruro	7,5	g
Sodio azide	0,2	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. Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 1 settimana a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

2.3.2 Brodo per lo svolgimento della prova di conferma

2.3.2.1 Brodo al Violetto di etile con Azide e Destrosio

Composizione:		
Peptone	20	g
Destrosio	5	g
Sodio cloruro	5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,7	g
Potassio diidrogeno fosfato	2,7	g
Sodio azide	0,4	g
Violetto di etile	0,83	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 1 settimana a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

2.4 Procedura

2.4.1 Prova presuntiva

Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva (2.3.1.1), agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30 minuti. Incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 48 ± 3 ore. Dopo incubazione, agitare ciascun tubo per verificare la presenza di torbidità (risultato positivo). Registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano intorbidimento del brodo e sottoporre i tubi positivi alla prova di conferma.

2.4.2 Prova di conferma

Prelevare, sterilmente, 1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo per la prova presuntiva (torbidità entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo al Violetto di etile con Azide e Destrosio (2.3.2.1) per la prova di conferma. Incubare i tubi a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per $24+24 (\pm 3)$ ore. Considerare positivi i tubi che presentano intorbidimento accompagnato da un deposito grigio-violetto sul fondo del tubo.

Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la Tab. 1 (vedi Sezione 6020), calcolare il valore dell'indice MPN.

2.5 Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

2.6 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

3. METODO B. Metodo del numero più probabile (MPN) in micropiastre a 96 pozzetti

Il metodo di seguito descritto corrisponde alla Norma ISO 7899-1: 1998. È applicabile all'analisi di tutti i tipi di acque superficiali e reflue, ed è particolarmente adatto all'esame di quelle ricche di materiale in sospensione. È di facile e rapido impiego.

3.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare le diluizioni da inoculare in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare.

Di seguito, per l'analisi di alcuni tipi di acqua vengono riportati alcuni esempi in funzione del presunto livello di contaminazione delle acque:

Tabella 1: Esempi di diluizione in funzione del livello di contaminazione delle acque

Tipo di acqua	N° di diluizioni	N° di pozzetti/diluizione		Valori limite di misura N° batteri/100 mL
Superficiale marina	2	64	a 1:2	15-3,5·10 ⁴
		32	a 1:20	
Superficiale dolce	4	24	a 1:2	40-3,2·10 ⁶
		24	a 1:20	
		24	a 1:200	
		24	a 1:2000	
Reflua grezza e trattata	6	16	a 1:2	60-6,7·10 ⁸
		oltre 16	a 1:200000	

3.2 Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, dalla preparazione del terreno culturale alla lettura dei risultati, oltre alla normale attrezzatura di laboratorio sono necessari:

- essiccatore;
- lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm;
- micropipetta a 8 canali per l'inoculo di 200 µL;

- nastro adesivo sterile;
- piastre Petri
- piastre sterili a 96 pozzetti da 350 μ L, non fluorescenti e a fondo piatto;
- puntali sterili per micropipetta;
- tubi per diluizioni.

3.3 Reattivi e terreni di coltura

3.3.1 Soluzione diluente

Composizione:		
Acqua di mare sintetica	22,5	g
Soluzione di blu di bromofenolo	10	mL
Acqua distillata	1000	mL

Miscelare gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15-20 minuti. Preparare la soluzione di blu di bromofenolo aggiungendo 0,04 g a 100 mL di etanolo al 50%. L'aggiunta di questa soluzione è facoltativa e utile solo per la colorazione della soluzione diluente.

3.3.2 Acqua distillata

Utilizzare acqua distillata priva di sostanze inibenti la crescita nelle condizioni di prova. Sterilizzare l'acqua distillata a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15-20 minuti.

3.3.3 Soluzione A: MUD/SF Medium

Composizione:		
Triptosio	40	g
Potassio fosfato biidrato	10	g
D(+)-galattosio	2	g
Poliossietilenesorbitano monooleato (Tween 80)	1,5	mL
Acqua distillata	900	mL

Il terreno completo si trova in commercio disidratato e pronto per l'uso, già distribuito in piastre a 96 pozzetti corredate di nastro adesivo. Per la procedura di analisi, seguire le istruzioni della ditta produttrice.

Qualora si proceda alla sua preparazione, a 900 mL di acqua distillata aggiungere triptosio, potassio fosfato biidrato, galattosio e Tween 80 (il Tween 80 è uno dei prodotti utilizzabili, disponibili in commercio; possono comunque essere utilizzati prodotti equivalenti purché sia dimostrato che forniscano gli stessi risultati), mantenendo in agitazione fino ad ebollizione e completa dissoluzione degli ingredienti. Far raffreddare.

3.3.4 Soluzione B: all'acido nalidixico

Composizione:		
Carbonato acido di sodio	4	g
Acido Nalidixico	250	mg
Acqua distillata	50	mL

Miscelare gli ingredienti a caldo mantenendo in agitazione. Fare raffreddare.

3.3.5 Soluzione C: al TTC

Composizione.		
Tallio acetato	2	g
TTC	0,1	g
Acqua distillata	50	mL

Miscelare gli ingredienti a caldo mantenendo in agitazione. Fare raffreddare.

3.3.6 Soluzione D: al MUD

Composizione:		
MUD	150	mg
N,N-dimetilformamide	2	mL

Miscelare gli ingredienti.

Nota: la N,N-dimetilformamide è tossica. Il prodotto può causare il cancro ed è Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione: protezione respiratoria (mascherina antipolvere e uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

La procedura di preparazione del substrato completo prevede la miscelazione delle soluzioni A, B, C, D. Aggiustare il pH a $7,5 \pm 0,2$.

Sterilizzare per filtrazione attraverso membrane con porosità nominale di $0,2 \mu\text{m}$. Distribuire in aliquote da 100 μL in ciascuno dei 96 pozzetti in piastra. Disidratare immediatamente in un essiccatore o sotto cappa a flusso laminare.

3.4 Procedura

3.4.1 Preparazione delle diluizioni

3.4.1.1 Acque con salinità $<30\text{‰}$

Aggiungere 9 mL di soluzione diluente (3.3.1) in tutti i tubi preparati in base al numero delle diluizioni prescelte. Agitare il campione per ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi e, usando una pipetta sterile, trasferire 9 mL del campione nel primo tubo contenente 9 mL di soluzione diluente (diluizione 1:2). Usando una nuova pipetta, dopo miscelazione, trasferire 1 mL della prima diluizione al secondo tubo (diluizione 1:20) e procedere allo stesso modo per le diluizioni successive.

3.4.1.2 Acque con salinità $\geq 30\text{‰}$

Aggiungere 9 mL di acqua distillata sterile (3.3.2) nel tubo della prima diluizione e 9 mL di soluzione diluente (3.3.1) a tutti i tubi successivi preparati in base al numero delle diluizioni prescelte. Agitare il campione per ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi e, usando una pipetta sterile, trasferire 9 mL del campione nel primo tubo contenente 9 mL di acqua distillata (diluizione 1:2). Usando una nuova pipetta, dopo miscelazione, trasferire 1 mL della prima diluizione al secondo tubo (diluizione 1:20) e procedere allo stesso modo per le diluizioni successive.

3.4.2 Semina delle diluizioni e incubazione

Con le adeguate regole di asepsi, versare la diluizione iniziale in una piastra Petri vuota sterile e, usando una micropipetta a 8 canali, distribuire 200 μ L in ciascun pozzetto contenente il terreno disidratato, corrispondente alla prima diluizione. Operare in modo analogo per le diluizioni successive, cambiando la piastra Petri e i puntali ad ogni diversa diluizione. Coprire la piastra di inoculo con nastro adesivo sterile per prevenire contaminazioni esterne e disidratazione dell'inoculo.

Incubare le piastre inoculate a $44\pm 1^\circ\text{C}$ per almeno 36 ore e fino ad un massimo di 72 ore.

3.4.3 Lettura dei risultati

I pozzetti che sotto luce ultravioletta risultano blu-fluorescenti sono considerati positivi.

3.5 *Espressione dei risultati*

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

Se nessuno dei pozzetti è positivo, esprimere il risultato come $<n/100$ mL, dove n è il valore dell'indice MPN per 1 pozzetto positivo nelle condizioni di diluizioni impiegate.

Per il calcolo dell'indice MPN procedere determinando il numero caratteristico in base al numero di pozzetti positivi per ciascuna diluizione selezionata, che, con più di 3 diluizioni, dovrà corrispondere ad un numero composto da 3 cifre. Individuato il numero caratteristico, per calcolare il valore dell'MPN consultare la norma NF T 90-433: agosto 1997, ovvero consultare le tabelle fornite con il terreno colturale.

3.6 *Resoconto di prova*

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

4. **METODO C. Metodo della filtrazione su membrana (MF)**

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione di streptococchi/enterococchi che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche prodotte dai microrganismi ricercati. Il metodo riportato corrisponde alla norma ISO 7899-2:2000.

4.1 *Volume da analizzare*

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

4.2 *Strumentazione e vetreria*

Normale attrezzatura di laboratorio.

4.3 *Reattivi e terreni di coltura*

4.3.1 Terreni di isolamento

4.3.1.1 Terreno di Slanetz e Bartley

<i>Composizione:</i>		
Triptosio	20	g
Estratto di lievito	5	g
Destrosio	2	g
Dipotassio idrogeno fosfato	4	g
Sodio azide	0,4	g
Agar	10	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±0,2		

4.3.1.2 Soluzione al 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC)

<i>Composizione:</i>		
2,3,5 – trifeniltetrazolio cloruro	1	g
Acqua	100	mL

Sciogliere l'indicatore nell'acqua e sterilizzare per filtrazione (0,2 µm). Preparata la soluzione, proteggere dalla luce e scartare se assume una colorazione rosata.

Il terreno completo, contenente TTC, si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice.

Nel caso debba essere preparato dai singoli ingredienti, aggiungere, a 1000 mL di substrato 4.3.1.1, mantenuto a una temperatura di 50-60°C, 10 mL di soluzione di TTC (4.3.1.2). Qualora sia necessario correggere il pH, utilizzare una soluzione di sodio carbonato (100 g/L). Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico e mutageno per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione. Non sterilizzare. Dopo la preparazione del terreno distribuire in capsule di Petri e conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

4.3.2 Substrati e reagenti di conferma

4.3.2.1 Terreno all'Esculina-bile-azide Agar

<i>Composizione:</i>		
Triptone	17	g
Peptone	3	g
Estratto di lievito	5	g
Bile	10	g
Esculina	1,0	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±0,1		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice.

Nota: adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico e mutageno per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione.

Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

4.3.2.2 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±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

4.3.2.3 Reattivo per la prova della catalasi

Perossido di idrogeno al 3%.

La soluzione è disponibile in commercio pronta all'uso alla concentrazione indicata.

Conservare al riparo dalla luce diretta e ad una temperatura di circa +4°C fino alla data di scadenza.

4.4 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con pori di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 36±1°C per 44±4 ore. Sono considerate come tipiche le colonie di colore dal rosa al rosso scuro e marrone (al centro o su tutta la colonia).

In presenza di colonie tipiche trasferire la membrana o singole colonie su piastre di esculinabile-azide agar (4.3.2.1) preriscaldate 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.

Ad integrazione del metodo è possibile effettuare la prova della catalasi (4.3.2.2) che prevede la selezione, isolando per striscio, delle colonie sospette su Agar soia triptone (4.3.2.3) e l'incubazione a 36±1°C per 24÷48 (±2) ore. Strisciare su un vetrino portaoggetti la colonia da saggiare e ricoprirla con alcune gocce di perossido di idrogeno al 3%. Evidenziare la reazione: l'assenza della formazione di bolle costituisce una prova positiva per la caratterizzazione dei microrganismi ricercati che mancano di catalasi. La presenza dell'enzima è invece rilevata dallo sviluppo di bollicine di gas.

Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica sulla base delle indicazioni della ditta produttrice.

4.5 Espressione dei risultati (revisione della scritta dell'equazione)

Il numero di microrganismi si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte eventualmente a conferma e riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL)

Dal numero di colonie caratteristiche contate, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \quad (1)$$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

A = numero di colonie confermate;

B = numero di colonie da sottoporre a conferma;

N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;

V_i = volume (mL) di campione analizzato;

V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);

F = fattore di diluizione.

4.6 Resoconto di prova

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

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard methods for the Examination of Water and Wastewater", XX Ed., (Washington, APHA).

DECRETO 12 agosto 1985. "Ricerca degli streptococchi fecali in acque di balneazione con la tecnica delle membrane filtranti: prova finale alternativa", Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana del 3 settembre 1985, n. 207.

HERNANDEZ J.F., GUIBERT J.M., DELATTRE J.M., OGER C., CHARRIERE C., HUGHES B., SERCEAU R. & SINEGRE F. (1991): "Miniaturized fluorogenic assays for enumeration of E. coli and enterococci in marine water, *Wat. Sci. and Technol.*, **24**, 137-141.

ISO 7899-1: 1998 (E) (1998): "Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci in surface and waste water", Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium, ISO Cont. 06/ 07899-01.

APPENDICE

Metodi rapidi (MF)

1. Introduzione

1.1. Generalità

Vengono proposti due metodi, da utilizzare eventualmente in alternativa a quelli proposti sopra, che consentono l'isolamento ed l'identificazione di streptococchi/enterococchi in campioni di acqua, su terreni agarizzati, mediante la tecnica delle membrane filtranti, nell'arco delle 24 ore.

In particolare uno dei due metodi (metodo A) prevede l'utilizzo di Agar Bile Esculina Azide; la capacità di idrolizzare esculina in presenza di sali biliari consente di enumerare direttamente i microorganismi appartenenti al gruppo streptococchi/enterococchi senza effettuare passaggi successivi. (Questa procedura è stata applicata presso i laboratori di Arpa Emilia-Romagna Sez. prov.le di Modena, su diverse matrici idriche fornendo risultati comparabili a quelli ottenibili con i terreni tradizionali [1]).

Il secondo metodo (metodo B) proposto corrisponde al Metodo EPA n. 1600, Maggio 1997 e

propone l'utilizzo di un terreno di coltura agarizzato contenente, oltre all'esculina ed al 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC), anche l'indoxil β -D-glucoside, che consente di evidenziare l'attività β -glucosidasi positiva tipica degli enterococchi mediante la formazione di un alone blu intorno alle colonie.

2. Volume da analizzare

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

3. METODO A

3.1 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

3.2 Reattivi e terreni di coltura

3.2.1 Terreni di isolamento

3.2.1.1 Terreno Bile Esculina Azide

Composizione:

Triptone	17	g
Peptone	3	g
Estratto di lievito	5	g
Bile	10	g
Esculina	1,0	g
Ferro (III) ammonio citrato	0,5	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio azide	0,25	g
Agar	13,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,1 \pm 0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Nel caso sia necessario correggere il pH, utilizzare una soluzione di sodio carbonato (100 g/L). Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico e mutageno per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a 121 \pm 3°C per 15 \pm 1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

3.3 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 μ m di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 35 \pm 2°C per 22 \pm 2 ore.

Sono considerate come tipiche le colonie convesse, traslucide o biancastre, diametro 1-2 mm, alone bruno scuro o nero ben evidente sul retro della piastra.

Si consiglia di non protrarre l'incubazione oltre le 24 ore in quanto la confluenza degli aloi potrebbe rendere difficoltosa la lettura.

Viceversa, nel caso di risultati negativi potrebbe essere opportuno prolungare l'incubazione fino alle 24 ore successive.

Analogamente ad altri terreni specifici per gli streptococchi/enterococchi anche questo terreno può non inibire del tutto lo sviluppo di microorganismi "non target"; pertanto, a discrezione dell'analista, si consiglia l'effettuazione della prova della catalasi (4.3.2.3) ed eventualmente l'identificazione delle colonie sospette con sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica.

4. METODO B

4.1 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4.2 Reattivi e terreni di coltura

4.2.1 Terreni di isolamento

4.2.1.1 Terreno Esculina Azide Indoxil β -D glucoside

Composizione:

Estratto di lievito	30	g
Peptone	10	g
Esculina	1,0	g
Actidione (Cicloesimide)	0,05	g
Sodio cloruro	15	g
Sodio azide	0,15	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	ml
Indoxil β -D glucoside	0.75	g
Acido Nalidixico	0.24	g
Trifenil Tetrazolio Cloruro (TTC)	0.02	g
pH finale	7,1 \pm 0,2	

Il terreno base si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice prima dell'aggiunta dell'acqua alla polvere aggiungere 0,75 grammi/L di Indoxil β -D glucoside quindi riscaldare fino a completa dissoluzione della polvere. Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico e mutageno per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione. Sterilizzare a 121 \pm 3°C per 15 \pm 1 minuti. quindi portare la temperatura a 44-46°C in bagnomaria.

Aggiungere separatamente 0,24 g/L di Acido Nalidixico (precedentemente disciolto in 5 mL di acqua distillata con l'aggiunta di poche gocce di NaOH 0,1 N) e 0,02 g/L di TTC.

Mescolare e distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare, conservare in frigorifero.

4.3 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 μ m di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 41 \pm 0,5°C per 22 \pm 2 ore. Sono considerate come tipiche le colonie che, indipendentemente dal colore, presentano un alone blu. L'utilizzo di mezzi di ingrandimento per la conta e di una piccola lampada UV possono aumentare la visibilità delle colonie.

Si consiglia di non protrarre l'incubazione oltre le 24 ore in quanto l'espansione degli aloni potrebbe rendere difficoltosa la lettura.

Viceversa, nel caso di risultati negativi potrebbe essere opportuno prolungare l'incubazione

per le 24 ore successive.

Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica sulla base delle indicazioni della ditta produttrice.

5. Espressione dei risultati

Il numero di microrganismi si calcola in base al numero di colonie tipiche contate ed eventualmente sottoposte a conferma, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

Dal numero di colonie caratteristiche contate, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_i} \quad (1)$$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

A = numero di colonie confermate;

B = numero di colonie da sottoporre a conferma;

N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;

V_i = volume (mL) di campione analizzato;

V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);

F = fattore di diluizione.

6. Resoconto di prova

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

BIBLIOGRAFIA

U.S.E.P.A. (1997): "Method 1600 May 1997. Membrane Filter Test Method for Enterococci in Water". Water".

SCIALOJA M.G., LEV D. & SBALCHIERO A. (2002): "Enterococchi fecali", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, settembre 2002.

7050. Conteggio delle colonie su agar a 36°C e 22°C

1. Introduzione

1.1 Generalità

Il conteggio delle colonie su agar è un parametro che permette di rilevare un gruppo eterogeneo di microrganismi, aerobi ed anaerobi facoltativi che hanno differenti capacità metaboliche e richieste nutrizionali. L'uso di temperature diverse permette di mettere in evidenza microrganismi mesofili (a 36°C) e psicrofili (22°C). Molti di essi possono appartenere alla microflora ambientale autoctona delle acque, presente indipendentemente da qualsiasi contaminazione. Tuttavia è stato anche messo in evidenza che alcuni dei microrganismi rilevati possono comprendere specie patogene e/o opportuniste patogene. Il parametro va considerato come integrazione degli altri parametri.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione di microrganismi coltivabili che producono colonie dopo incubazione a due temperature diverse.

1.3 Principio del metodo

La procedura analitica permette di contare le colonie che i microrganismi hanno prodotto nella compagine del terreno agarizzato, analizzando piccole aliquote note di campione che, vengono miscelate con il substrato mantenuto fuso e lasciato successivamente solidificare in capsule Petri. Di seguito vengono proposti tre substrati alternativi.

1.4 Campo di applicazione

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

2. Tecnica dell'agar-germi

2.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è generalmente necessario analizzare diluizioni scalari del campione; per acque già sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate diluizioni minori. Il metodo generalmente non consente di analizzare volumi superiori a 2 mL.

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. Reattivi e terreni di coltura

4.1 Substrati di isolamento

4.1.1 Plate Count Agar

<i>Composizione:</i>		
Tryptone	5	g
Estratto di lievito	2,5	g
Glucosio	1	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7±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, il terreno in beuta o in tubo, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

4.1.2 R2A

<i>Composizione:</i>		
Estratto di lievito	0,5	g
Polipeptone	0,5	g
Idrolisato acido di caseina	0,5	g
Glucosio	0,5	g
Amido solubile	0,5	g
Fosfato bipotassico	0,3	g
Solfato di magnesio	0,024	g
Sodio piruvato	0,3	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 il terreno, in beuta o tubo, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

Il substrato, con basse concentrazioni di nutrienti, è particolarmente adatto per l'analisi di acque oligotrofiche.

4.1.3 Agar all'estratto di lievito

<i>Composizione:</i>		
Estratto di lievito	3	g
Tryptone	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. Sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

Il substrato è riportato nella norma ISO 6222:1999.

5. Procedura

La procedura analitica per la conta dei microrganismi a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ è la stessa per entrambi i parametri.

Seminare in capsule Petri vuote aliquote non superiori a 2 mL del campione o di una sua diluizione. Versare, rispettando le regole di asepsi, circa 15 mL di substrato di isolamento (4.1) nella capsula contenente l'inoculo. Non superare i 20 minuti di intervallo tra il momento dell'inoculo in capsula e l'aggiunta del terreno colturale che deve essere mantenuto liquefatto in bagnomaria ad una temperatura intorno a 45°C . Mescolare accuratamente ruotando in un verso e nell'altro la piastra per permettere una completa miscelazione tra il terreno ed il campione. Lasciare solidificare e porre ad incubare a $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ per 44 ± 4 ore e a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ per 68 ± 4 ore. Dopo incubazione, contare tutte le colonie ottenute, eventualmente con idoneo sistema di ingrandimento, su fondo scuro e scartare le piastre con crescita confluyente.

6. Espressione dei risultati

Riportare il numero ottenuto come Unità Formanti Colonia per millilitro (UFC/mL) del campione per ciascuna temperatura di incubazione considerando l'eventuale diluizione effettuata.

7. Resoconto di prova

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

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for examination of water and wastewater", XX Ed., (Washington, APHA).

7060. Spore di clostridi solfito riduttori

1. Introduzione

1.1 Generalità

I clostridi sono microrganismi anaerobi obbligati; bacilli gram-positivi; producono ATP esclusivamente tramite fosforilazione a livello del substrato (che può essere costituito da amminoacidi, cellulosa, zuccheri semplici). Riducono il solfito con produzione di solfuri e producono spore termoresistenti. Sono normalmente saprofiti e vivono negli strati superficiali del terreno o nell'intestino di alcuni animali, compreso l'uomo. Il loro numero nelle feci, rispetto ai coliformi e agli streptococchi, è inferiore, in rapporto rispettivamente di circa 1/100 e 1/10. Alcune specie producono potenti esotossine (*Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum*) che causano sindromi particolarmente gravi. Per i controlli della qualità delle acque i microrganismi vengono ricercati nella loro forma sporale. La loro presenza può essere indice di inquinamento fecale anche pregresso. Per la loro capacità di produrre forme di resistenza (spore), sono in grado di sopravvivere più a lungo nell'ambiente e di resistere ai trattamenti di depurazione e di disinfezione delle acque.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione delle spore di clostridi solfito-riduttori.

1.3 Principio del metodo

Il metodo consente di valutare la concentrazione delle spore dei microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* presenti in un volume d'acqua preventivamente trattato al calore per distruggere le forme microbiche vegetative, favorendo contemporaneamente la germinazione delle forme sporali.

Possano essere utilizzate due tecniche analitiche:

- *Metodo A*: metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo è calcolata la concentrazione delle spore in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione in terreno colturale. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta (Tabella 2).
- *Metodo B*: metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale. Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento delle spore di clostridi che garantiscono buoni risultati in fase analitica, anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutte le specie presenti. È necessario in ogni caso tenere in considerazione che la scelta di un substrato o di un altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore, a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività.

1.4 Campo di applicazione

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

2. METODO A. Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione delle spore in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.

Il metodo è particolarmente adatto per l'esame di acque che presentano un'elevata torbidità.

2.1 Volume da analizzare

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

3. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, per lo svolgimento dell'analisi, è necessario avere a disposizione:

- giara per anaerobiosi

4. Reattivi e terreni di coltura

4.1 METODO A. Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

4.1.1 Agar al Triptone Solfito e Neomicina

Composizione:

Peptone o Triptone	15	g
Solfito di sodio	1	g
Solfato di neomicina	0,02	g
Solfato di polimixina	0,05	g
Estratto di lievito	10	g
Citrato ferrico	0,5	g
Agar	13,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±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. Distribuire in tubi di terreno e autoclavare a $118\pm 3^\circ\text{C}$ per 20 ± 1 minuti. Conservare a circa $+4^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

4.1.2 Olio di vaselina sterile

4.1.3 Agar nutritivo base al sangue di coniglio

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Peptone	5	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno di base 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. Distribuire in provettoni o beute, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti.

Dopo sterilizzazione, preparare, con le normali procedure, alcune piastre di terreno senza aggiunta di sangue; in altre piastre, in condizioni di asepsi, trasferire 0,5 mL di sangue defibrinato di coniglio (4.1.4) e aggiungere circa 12-13 mL di agar nutritivo preventivamente sciolto e portato a 50-60°C in bagno termostato, miscelare e lasciar solidificare a temperatura ambiente. Il terreno colturale al sangue ha tempi di conservazione molto brevi; si consiglia pertanto di prepararlo al momento dell'uso.

4.1.4 Sangue defibrinato di coniglio

Il sangue defibrinato di coniglio è reperibile in commercio e si può conservare per circa una settimana a circa +4°C in condizioni ottimali.

4.1.5 Agar Columbia con 5% di sangue di montone

Composizione:

Bio-polyptone	10	g
Idrolizzato di proteine animali e vegetali	10	g
Bio-miotone	3	g
Amido di mais	1	g
Cloruro di sodio	5	g
Sangue di montone	50	mL
Agar	13,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3±0,2		

Esistono in commercio diversi substrati per la crescita dei microrganismi appartenenti al genere *Clostridium*. In alternativa all'Agar nutritivo al sangue di coniglio (4.1.3) qui viene anche riportata la composizione dell'Agar Columbia con 5% di sangue di montone. Il terreno si trova in commercio già pronto per l'uso e preparato in piastre Petri. Ha tempi di conservazione molto brevi; si consiglia pertanto di comprarne piccoli lotti.

È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un substrato o di un altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore, a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di selettività, produttività, ecc.

4.1.6 Perossido di idrogeno al 3%

La soluzione è disponibile in commercio pronta all'uso alla concentrazione indicata. Conservare al riparo dalla luce diretta e ad una temperatura di circa +4°C fino alla data di scadenza.

5. Procedura

5.1 Pretrattamento del campione

Mantenere il campione per 15 ± 1 minuti a $75 \pm 5^\circ\text{C}$ in bagno termostato per l'inattivazione delle forme vegetative. Raffreddare il campione sotto acqua fredda prima di sottoporlo ad analisi.

5.2 Isolamento

Inoculare aliquote del campione in concentrazioni scalari in tubi contenenti il terreno (4.1.1). Effettuare l'inoculo nei tubi con il terreno disciolto e mantenuto tale alla temperatura di circa 45°C , avendo cura di distribuire bene il campione nel terreno evitando la formazione di bolle d'aria. Lasciar raffreddare ed aggiungere in ogni tubo alcuni millilitri di olio di vaselina (4.1.2). Incubare a $46 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore.

6. Conteggio ed identificazione delle colonie

Considerare positivi i tubi con crescita di colonie nello spessore dell'agar che provocano annerimento del terreno.

7. Conferma

Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Clostridium*, è necessario eseguire sulle colonie rilevate la colorazione di Gram e la prova della catalasi (7.1). Per una identificazione, a livello di specie, dei microrganismi isolati si possono utilizzare i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio.

Trasferire la colonia da saggiare, mediante semina per strisciamento in superficie in due piastre contenenti agar nutritivo con sangue di coniglio (4.1.3) o in alternativa in due piastre di agar Columbia con 5% di sangue di montone (4.1.5). Incubare una piastra a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore, l'altra alla stessa temperatura per 24 ore, ma in anaerobiosi.

I microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* cresceranno unicamente sul terreno incubato in anaerobiosi. Procedere allo svolgimento della prova della catalasi.

7.1 Prova della catalasi

La prova della catalasi serve per differenziare i batteri solfito-riduttori appartenenti al genere *Clostridium* (catalasi negativi) da quelli appartenenti al genere *Bacillus* (catalasi positivi). Seminare la colonie da saggiare su agar nutritivo (4.1.3) e incubare a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore in anaerobiosi. Strisciare su un vetrino da microscopio una colonia in esame quindi ricoprire con una goccia di perossido d'idrogeno (4.1.6).

La reazione negativa, tipica del genere *Clostridium*, è evidenziata dalla mancata formazione di bolle (liberazione di gas).

8. Espressione dei risultati

Sulla base delle positività ottenute consultare la Tab. 1 (vedi Sezione 6020) ed esprimere il risultato come MPN/100 mL.

Dal numero di colonie caratteristiche contate e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di spore di clostridi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \quad (1)$$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

A = numero di colonie confermate;

B = numero di colonie da sottoporre a conferma;

N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;

V_t = volume (mL) di campione analizzato;

V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);

F = fattore di diluizione.

9. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di spore di clostridi solfito riduttori per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

10. METODO B. Metodo della filtrazione su membrana (MF)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione delle spore di clostridi che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche prodotte dai microrganismi ricercati. Di seguito vengono proposti due substrati di isolamento alternativi.

10.1 Volume da analizzare

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

11. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, per lo svolgimento dell'analisi, è necessario avere a disposizione:

- giara per anaerobiosi.

12. Reattivi e terreni di coltura

12.1 Terreni di isolamento

12.1.1 Agar al Solfito Polimixina Solfadiazina

Composizione:		
Solfito di sodio	0,5	g
Solfato di polimixina	0,01	g
Sulfodiazina	0,12	g
Triptone o peptone	15	g
Estratto di lievito	10	g
Citrato di ferro	0,5	g
Sodio tioglicollato	0,1	g
Sorbitan monooleato	0,05	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±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. Distribuire in provettoni o beute fino all'analisi. Sterilizzare a $118\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare a circa $+4^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

12.1.2 Terreno di base: Triptosio Solfito Cicloserina Agar

Composizione:		
Triptosio	15	g
Peptone di soia	5	g
Estratto di lievito	5	g
Metabisolfito di sodio	1	g
Citrato di ferro (III) e ammonio	1	g
Agar	14	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,6±0,1		

Il terreno così come formulato è riportato in ISO WD 6461-2:2001 e costituisce il terreno di base a cui deve essere aggiunta un'aliquota della soluzione di cicloserina (12.1.3) per la preparazione del substrato completo. Il metodo che utilizza questa formulazione consente di isolare in modo più specifico *Clostridium perfringens*.

Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provettoni o beute fino all'analisi. Sterilizzare a $121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare a circa $+4^{\circ}\text{C}$ per non più di due settimane in condizioni ottimali.

12.1.3 Soluzione di Cicloserina

Composizione:		
D-cicloserina	10	g
Acqua	100	mL

Sciogliere la cicloserina in acqua e sterilizzare per filtrazione attraverso membrane con pori di $0,45\ \mu\text{m}$ di diametro. Distribuire in tubi e conservare a temperatura intorno a -20°C . Per la preparazione del substrato completo, a 1000 mL di terreno di base (12.1.2) aggiun-

gere 4 mL di soluzione di cicloserina (12.1.3). Distribuire in piastre Petri e conservare a circa +4°C per non più di due giorni dalla preparazione.

12.1.4 Agar nutritivo al sangue di coniglio (4.1.3)

12.1.5 Sangue defibrinato di coniglio (4.1.4)

12.1.6 Agar Columbia con 5% di sangue di montone (4.1.5)

12.1.7 Perossido di idrogeno al 3% (4.1.6)

13. Procedura

13.1 *Pretrattamento del campione* (vedi Paragrafo 5.2)

13.2 *Filtrazione e incubazione*

Sciogliere il terreno di isolamento Agar al Solfito Polimixina Solfadiazina (12.1.1) e versarne un'aliquota in una piastra Petri, lasciar solidificare a temperatura ambiente. Mantenere il rimanente terreno allo stato liquido alla temperatura di 50-60°C.

Filtrare un'aliquota di campione pretrattato utilizzando una membrana di acetato di cellulosa con porosità nominale di 0,45 µm. Trasferire la membrana sul terreno facendola aderire perfettamente. Versare su di essa, con cautela, un'aliquota dello stesso terreno mantenuto allo stato liquido in modo da ricoprirla interamente e lasciare solidificare a temperatura ambiente.

Incubare a 36±1°C per 48±2 ore in condizioni anaerobiche in giara o con apposito kit per anaerobiosi.

Se utilizzato il terreno di isolamento completo Triptosis Solfito Cicloserina Agar, filtrare un'aliquota di campione pretrattato utilizzando una membrana di acetato di cellulosa con porosità nominale di 0,45 µm. Trasferire la membrana sul substrato completo facendola aderire perfettamente. Incubare a 44±1°C per 21±3 ore in condizioni anaerobiche in giara o con apposito kit per anaerobiosi.

13.3 *Conteggio ed identificazione delle colonie*

Su entrambi i terreni di isolamento (12.1) la presenza di anaerobi solfito-riduttori è evidenziata dalla comparsa di colonie nere con alone nerastro evidenziabile sopra o sotto la membrana.

14. Conferma

Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Clostridium*, è necessario eseguire, sulle colonie rilevate, la colorazione di Gram e la prova della catalasi (14.1). Per una identificazione, a livello di specie, dei microrganismi isolati si possono utilizzare i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio.

Trasferire la colonia da saggiare, mediante semina per strisciamento in superficie in due piastre contenenti agar nutritivo con sangue di coniglio (12.1.3) o in alternativa in due piastre di agar Columbia con 5% di sangue di montone (12.1.4). Incubare una piastra a 36±1°C per 24 ore, l'altra alla stessa temperatura per 24 ore, ma in anaerobiosi.

I microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* cresceranno unicamente sul terreno incubato in anaerobiosi. Procedere allo svolgimento della prova della catalasi.

14.1 Prova della catalasi

La prova della catalasi serve per differenziare i batteri solfito-riduttori appartenenti al genere *Clostridium* (catalasi negativi) da quelli appartenenti al genere *Bacillus* (catalasi positivi). Seminare la colonie da saggiare su agar nutritivo (12.1.3) e incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore in anaerobiosi. Strisciare su un vetrino da microscopio una colonia in esame quindi ricoprire con una goccia di perossido d'idrogeno (12.1.6).

La reazione negativa, tipica del genere *Clostridium*, è evidenziata dalla mancata formazione di bolle (liberazione di gas).

15. Espressione dei risultati

Riportare il numero di spore di clostridi solfito riduttori come UFC/100 mL.

Dal numero di colonie caratteristiche contate e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di spore di clostridi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \quad (1)$$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

A = numero di colonie confermate;

B = numero di colonie da sottoporre a conferma;

N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;

V_t = volume (mL) di campione analizzato;

V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);

F = fattore di diluizione.

16. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di spore di clostridi solfito riduttori per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Standard Methods for examination of water and wastewater", XX Ed., (Washington, APHA).

KONEMAN S.D., ALLEN V.R., DOWELL Jr., JANDA W.M., SCHRECKENBERGER P.C. & WINN W.C. Jr. (1995): "Testo atlante di microbiologia diagnostica", II Ed., Delfino editore, Roma.

UNICHIM (1994): "Acque destinate al consumo umano - Metodi Microbiologici", Parte I, Manuale N. 168, Milano.

7070. *Aeromonas* spp

1. Introduzione

1.1 Generalità

I microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas* sono bastoncelli motili e non motili, gram-negativi, ossidasi positivi, aerobi facoltativi o anaerobi; il metabolismo del glucosio è sia respiratorio che fermentativo. Attualmente la tassonomia del genere è in fase di revisione per quanto riguarda il rilievo delle caratteristiche fenotipiche e delle proprietà genetiche. Al momento è stata accertata l'esistenza di 15 gruppi di ibridizzazione non tutti distinguibili su base biochimica. La classificazione tradizionale riporta la distinzione tra *Aeromonas salmonicida*, specie psicrofila, e *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*, specie mesofile motili. Tuttavia, in attesa di una definitiva classificazione del genere, è stato suggerito di riportare le specie di *Aeromonas* sotto l'unico termine generico di "gruppo o complesso degli *A. hydrophila*", anche in attesa di risolvere le problematiche inerenti il ruolo che le diverse specie possono svolgere come patogeni. Alcuni genotipi sono infatti considerati responsabili di patologie (infezioni sistemiche e cutanee) per l'uomo e di recente l'OMS ha inserito *Aeromonas* nell'elenco dei potenziali agenti di gastroenteriti.

Il suo rilevamento nelle acque sembra seguire un andamento stagionale in relazione alla temperatura dell'acqua. Inoltre, in acque clorate la crescita di *Aeromonas* sembra sia in rapporto anche alla concentrazione di cloro. La sua presenza viene rilevata anche in assenza di *Escherichia coli* e difficile risulta stabilire un rapporto tra le sue densità e quelle degli indici di contaminazione fecale, soprattutto in acque poco inquinate e in acque trattate.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione dei microrganismi appartenenti al gruppo degli *Aeromonas*.

1.3 Principio del metodo

La procedura analitica si basa sulla filtrazione su membrana e sul successivo conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua.

1.4 Campo di applicazione

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

1.5 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per l'esame di acque reflue o comunque di bassa qualità è possibile analizzare anche diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

3. Reattivi e terreni di coltura

3.1 Substrato di isolamento

3.1.1 m-Aeromonas Selective Agar Base

<i>Composizione:</i>		
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±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±3°C per 15±1 minuti. Lasciare raffreddare fino a circa 50°C ed aggiungere sterilmente 1% di Ampicillina. Mescolare e distribuire in piastre Petri. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, a circa +4°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

Esistono in commercio diversi substrati usati per la crescita di *Aeromonas* che garantiscono buoni risultati in fase analitica. Qui viene riportata la composizione del m-Aeromonas Selective Agar Base. È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un substrato o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività.

3.1.2 Soluzione di Ampicillina all'1%

<i>Composizione:</i>		
Ampicillina	5	mg
Acqua distillata	5	mL

L'antibiotico è anche disponibile in commercio in forma disidratata in fiale; in alternativa sciogliere l'ampicillina in acqua distillata e sterilizzare per filtrazione. Aggiungere al substrato di isolamento già sterilizzato in ragione di 1 mL/100 mL di terreno.

3.2 *Substrato di crescita*

3.2.1 *Tryptone Soia Agar*

<i>Composizione:</i>		
Tryptone	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±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

Esistono in commercio diversi substrati non selettivi per la crescita dei microrganismi; qui viene riportata la composizione del Tryptone Soia Agar. È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un substrato o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività.

3.3 *Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato*

3.3.1 *Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%*

<i>Composizione:</i>		
N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uso sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso.

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

4. **Procedura**

4.1 *Filtrazione ed incubazione*

Filtrare l'aliquota di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro (porosità nominale 0,45 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Trasferire sterilmente la membrana in piastre contenenti il substrato di isolamento (3.1.1) addizionato con ampicillina (3.1.2) evitando la formazione di bolle d'aria tra la membrana stessa e la superficie del terreno agarizzato. Incubare alla temperatura di 28±1°C per 24±2 ore.

4.2 *Identificazione e conteggio delle colonie*

Sul substrato di isolamento i microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas* sviluppano, con viraggio del terreno, colonie di colore giallo, caratteristica dovuta alla fermentazione del-

la 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.

5. Conferma

Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Aeromonas*, è necessario eseguire, sulle colonie rilevate, la colorazione di Gram e la prova della citocromossidasi. Per una identificazione, a livello di specie, dei microrganismi isolati si possono utilizzare i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio che, tuttavia, attualmente permettono solo la differenziazione di *A. hydrophila*/*A. caviae* da *A. sobria*.

Isolare le colonie da sottoporre a conferma sul terreno Triptone Soia Agar (3.2.1) e incubare a $28\pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore. Procedere allo svolgimento della colorazione di Gram e della prova della citocromossidasi (5.1).

5.1 Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas* in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi: *Aeromonas* è ossidasi-positivo.

Dal terreno Triptone Soia Agar (3.2.1) prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (3.3.1) 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 10 secondi.

6. Espressione dei risultati

Riportare il numero di *Aeromonas* come UFC/100 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 seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \quad (1)$$

dove:

C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;

A = numero di colonie confermate;

B = numero di colonie da sottoporre a conferma;

N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;

V_t = volume (mL) di campione analizzato;

V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);

F = fattore di diluizione.

7. Resoconto di prova

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

BIBLIOGRAFIA

BONADONNA L. & DI GIROLAMO I. (1994): "Aeromonas in acque potabili: un rischio reale o potenziale?", *Ann. Igiene e Sanità Pubblica*, **50**, 81-90.

HAVELAAR A.H., DURING M. & VERSTEEGH J.F.M. (1987): "Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration, *Journal Applied Bacteriology*, **62**, 279-287.

HAVELAAR A.H. & VONK M. (1988): "The preparation of Ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water, *Letters in Applied Microbiology*, **7**, 169-171.

SEMPRONI M. & BONADONNA L. (1997): "Metodo per la ricerca e l'isolamento di *Aeromonas* sp in acque destinate al consumo umano", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, luglio 1997, 11-15.

7080. *Salmonella spp*

1. Introduzione

Il genere *Salmonella* comprende microrganismi bastoncellari appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriacee, gram negativi, generalmente mobili con flagelli peritrichi, anaerobi facoltativi. Le salmonelle sono classificate in base ai caratteri sierologici che differenziano circa 2.000 tra tipi e sierotipi. Sono prevalentemente caratterizzate dalla presenza di due tipi di antigeni: antigeni somatici (O), termostabili e resistenti all'azione di acidi e alcoli, e antigeni ciliari (H), termolabili. *Salmonella typhi* ed altre salmonelle possiedono anche un antigene denominato Vi, strettamente correlato all'antigene somatico, ma diverso da questo in quanto termolabile. Sono microrganismi patogeni e possono essere strettamente adattati ad un particolare ospite o essere ubiquitari e ritrovarsi in ospiti diversi. L'infezione è a trasmissione fecale-orale o associata alla contaminazione di alimenti e di acqua. Nell'uomo può manifestarsi con febbri enteriche, gastroenteriti, setticemia e tifo.

Salmonella è ampiamente diffusa nell'ambiente dove può anche sopravvivere. La sua presenza nell'ambiente idrico rappresenta inequivocabilmente l'esistenza di una contaminazione fecale primaria (immissione diretta di scarichi fognari) o secondaria (dilavamento di suoli contaminati). Nelle acque reflue la presenza di *Salmonella* è variabile nelle densità in funzione delle patologie diffuse all'interno della popolazione.

1.2 Obiettivo

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

1.3 Principio del metodo

Il metodo proposto 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 possono comprendere Prearricchimento, Arricchimento, Isolamento ed eventualmente, Conferma biochimica e Conferma sierologica.

1.4 Campo di applicazione

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

2. Volume da analizzare

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

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. Reattivi e terreni di coltura

4.1 Substrato di prearricchimento

4.1.1 - Acqua Peptonata Tamponata

Composizione:		
Peptone	10	g
Sodio cloruro	5	g
Disodio idrogeno fosfato·12H ₂ O	9	g
Potassio diidrogeno fosfato	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 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 distribuire in beute e sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

4.2 Substrato di arricchimento

4.2.1 Brodo di arricchimento di Rappaport Vassiliadis

Composizione:		
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	8	g
Potassio diidrogeno fosfato	1,6	g
Magnesio cloruro·6H ₂ O	40	g
Verde malachite	40	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 5,2±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. Distribuire in tubi e sterilizzare a 115±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C per non più di una settimana in condizioni ottimali. L'aggiunta al brodo di arricchimento di 10 µg/mL di sodio novobiocina può migliorare il recupero di *Salmonella*.

4.2.2 Brodo di base al Tetratonato

Composizione:		
Peptone	5	g
Sali di bile	1	g
Sodio tiosolfato	30	g
Calcio carbonato	10	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 8,4±0,2		

Il terreno completo deve essere preparato al momento dell'uso. 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. Raffreddare sotto i 60°C e aggiungere 2 mL di una soluzione di iodio preparata sciogliendo 6 g di cristalli di iodio e 5 g di ioduro di potassio in 20 mL di acqua distillata. Non riscaldare il terreno dopo l'aggiunta di iodio. Distribuire in tubi sterili. Il terreno è adatto alla ricerca anche di *S. typhi*.

4.3 Substrati di isolamento

4.3.1 Hektoen Enteric Agar

Composizione:

Peptone	12	g
Estratto di lievito	3	g
Sali biliari	9	g
Lattosio	12	g
Saccarosio	12	g
Salicina	2	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio iposolfito	5	g
Citrato ferrico ammoniacale	1,5	g
Agar	13,5	g
Blu di bromotimolo	64	mg
Fucsina acida	40	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,6±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 agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento di *Salmonella* che garantiscono buoni risultati in fase analitica anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutti i sierotipi di *Salmonella* presenti. È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un substrato o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività.

4.3.2 Xilosio Lisina Desossicolato

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
Rosso fenolo	0,08	g
Desossicolato di sodio	2,5	g
Tiosolfato di sodio	6,8	g
Citrato di ferro ammoniacale	0,8	g
Agar	13,5	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 per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

4.3.3 Rambach Agar

<i>Composizione:</i>		
Glicole propilenico	10,5	g
Estratto di lievito	2	g
Peptone	5	g
Sodio desossicolato	1	g
Sodio cloruro	5	g
Rosso neutro	0,03	g
Cromogeno	1,5	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali. È un terreno colturale particolarmente selettivo per *Salmonella*, le cui colonie sono ben individuabili.

4.4 Substrato di crescita

4.4.1 Triptone Soia Agar

<i>Composizione:</i>		
Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

4.5 Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

4.5.1 Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

<i>Composizione:</i>		
N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uso sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso.

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

4.6 Substrato per la prova della fermentazione dei carboidrati

4.6.1 Agar al ferro di Kligler

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
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 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. Distribuire in provette e, dopo sterilizzazione a 121±3°C per 15±1 minuti, lasciare solidificare in posizione inclinata per ottenere una superficie a becco di clarino. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

4.7 Substrato per la prova della decarbossilazione della lisina

4.7.1 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	13,5	g
Sodio tiosolfato	40	mg
Porpora 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 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. Distribuire in provette e, dopo sterilizzazione a 121±3°C per 12±1 minuti, lasciare solidificare in posizione inclinata per ottenere una superficie a becco di clarino. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

5. Procedura

5.1 Fase di prearricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo; è una fase che 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 1000 mL di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro (porosità nominale 0,45 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se è necessario per presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua Peptonata Tamponata (4.1.1) contenuta in beuta e incubare a 36±1°C per 18-24 ore.

5.2 Fase di arricchimento

Eseguire l'inoculo di un'aliquota del campione in Brodo di arricchimento di Rappaport Vassiliadis (4.2.1) o in alternativa nel Brodo alla Selenite e Cistina (4.2.2). Quest'ultimo è raccomandato qualora debba essere ricercata in particolare *S. typhi*. Incubare il Brodo di Rappaport Vassiliadis a 42±1°C per 24+24 ore.

Incubare il Brodo alla Selenite e Cistina a 36±1°C per 24+24 ore.

5.3 Fase di isolamento ed identificazione delle colonie

Dal brodo di arricchimento (4.2.1 o 4.2.2) eseguire, prelevando un'ansata, 2 subcolture per strisci multipli sui terreni di isolamento: la prima dopo 24±2 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 48±2 ore. Incubare le piastre a 36±1°C per 24 ore.

Su Hektoen Enteric Agar le colonie sospette di *Salmonella* si presentano verdi con margini netti con o senza centro nero.

Su Xilosio Lisina Desossicolato le colonie sospette di *Salmonella* si presentano rosse con centro nero, lucide, convesse e con margini netti.

Su Rambach Agar il 97-99% delle colonie di *Salmonella* si presentano rosse. *S. paratyphi* e *S. typhi* crescono invece come colonie incolori. Alcuni stipiti di *Pseudomonas* possono crescere come colonie rosse; tuttavia la loro presenza può essere messa in evidenza con la prova della citocromossidasi (6.1).

6. Conferma biochimica

Qualora si ritenga opportuno, è possibile procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Salmonella* delle colonie sospette eseguendo la prova della citocromossidasi (6.1) della fermentazione dei carboidrati (6.2) e della decarbossilazione della lisina (6.3).

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

Prima di effettuare ciascuna prova si suggerisce, onde verificarne la purezza, di subcoltivare le colonie sospette su Tryptone Soia Agar (4.4.1) e incubare a 36±1°C per 24±2 ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

6.1 Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Salmonella* da quelli appartenenti al genere *Pseudomonas* che possono produrre colonie simili sul terreno di isolamento. Le salmonelle sono ossidasi-negative.

Dal terreno Tryptone Soia Agar (4.4.1) prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, la colonia cresciuta e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (4.5.1) pre-

parato 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 10 secondi una colorazione blu-violetto.

6.2 Prova della fermentazione dei carboidrati

Dal terreno Triptone Soia Agar (4.4.1) 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 (4.6.1). 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. Sebbene *Citrobacter* possa dare le stesse reazioni di *Salmonella*, per la interpretazione dei risultati si devono annotare le seguenti reazioni: Utilizzazione dei carboidrati su Kligler Iron Agar

- Reazione sulla superficie inclinata	Acidità: Alcalinità:	colore giallo colore rosso
- Reazione di profondità	Acidità: Alcalinità:	colore giallo colore rosso
- Produzione di gas	Presente: Assente	bolle o rottura dell'agar
- Produzione di H ₂ S:	Presente: Assente	annerimento del terreno

Le reazioni dopo 18-24 ore di incubazione a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per alcune delle specie di *Salmonella* sono le seguenti:

Microrganismo	Superficie	Profondità	Gas	H ₂ S
<i>Salmonella</i> spp.	Rosso	Giallo	+	+
<i>S. typhi</i>	Rosso	Giallo	-	+
<i>S. paratyphi</i>	Rosso	Giallo	-	-

6.3 Prova della decarbossilazione della lisina

Dal terreno Triptone Soia Agar (4.4.1) prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro e lisina (4.7.1). Incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore.

I microrganismi appartenenti al genere *Salmonella* producono una reazione alcalina (violetta) sia del becco, sia del cilindro; una colorazione gialla (acida) indica una reazione negativa. Gli stipiti che producono idrogeno solforato determinano un annerimento del terreno.

7. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *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.

8. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come *Salmonella*: Assente o Presente nel volume esaminato e, se del caso, il sierotipo individuato.

9. Resoconto di prova

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

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

BONADONNA L., LATINI M., DI GIROLAMO I. & OTTAVIANI M. (1994): "Valutazione della contaminazione microbiologica di fanghi di depurazione di reflui civili: problemi legati alle metodiche di analisi", Rapporti ISTISAN 94/17, Roma, 84 p.

IRSA (1983): "Metodi analitici per i fanghi", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **64**, Roma.

7090. *Vibrio spp*

1. Introduzione

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

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

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

1.2 Obiettivo

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

1.3 Principio del metodo

Il metodo proposto consente di valutare la Presenza/Assenza di *Vibrio* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che possono comprendere Arricchimento, Isolamento ed eventualmente, Conferma biochimica e Conferma sierologica.

1.4 Campo di applicazione

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

2. Volume da analizzare

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

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. Reattivi e terreni di coltura

4.1 Brodo di arricchimento

4.1.1 Acqua Peptonata Alcalina

Composizione:

Peptone	10	g
Sodio cloruro	10	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 8,5±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione, ma evitando il surriscaldamento. Agitare frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Raffreddare e modificare il pH con l'aggiunta di un'aliquota di NaOH 0,1 N. Distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C per non più di quattro settimane in condizioni ottimali.

4.1.2 Soluzione di idrossido di sodio 0,1 N

Composizione:

Idrossido di sodio	4	g
Acqua distillata	1000	mL

Agitare vigorosamente con barretta magnetica fino a completa dissoluzione.

4.2 Substrato di isolamento

4.2.1 Agar al Tiosolfato Citrato Bile e Saccarosio

Composizione:

Estratto di lievito	5	g
Peptone	10	g
Sodio tiosolfato	10	g
Sodio citrato	10	g
Sali di bile	8	g
Saccarosio	20	g
Sodio cloruro	10	g
Citrato ferrico	1	g
Agar	14	g
Blu di bromotimolo	40	mg
Blu timolo	40	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 8,6±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione, ma evitando il surriscaldamento. Agitare frequentemente per ottenere la completa soluzione

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

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

4.3 Substrati di crescita

4.3.1 Triptone Soia Agar con NaCl all'1%

Composizione:		
Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Aggiungere 1 mL di una soluzione di NaCl per ogni 100 mL di terreno preparato. Sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

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

Composizione:		
Digerito pancreatico di caseina	17	g
Digerito papainico di farina di soia	3	g
Sodio cloruro	5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,5	g
Destrosio	2,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare e agitare frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Aggiungere 1 mL di una soluzione di NaCl per ogni 100 mL di terreno preparato. Distribuire in tubi aliquote di circa 10 mL. Sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C per non più di un mese.

4.4 Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

4.4.1 Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

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.

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

4.5 Vibriostatico

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

5. Procedura

5.1 Fase di Arricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo. Filtrare un volume di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro (porosità nominale 0,45 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se è necessario per presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua Peptonata Alcalina (4.1.1). Incubare a 36±1°C per 6-8 ore, fino a un massimo di 18 ore.

5.2 Fase di Isolamento ed identificazione delle colonie

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

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

6. Conferma biochimica

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

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

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

6.1 Prova della citocromossidasi

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

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

6.2 Prova della suscettibilità al vibriostatico

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

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

7. Conferma sierologica

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

Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

8. Espressione dei risultati

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

9. Resoconto di prova

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

BIBLIOGRAFIA

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

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

7100. Uova di elminti

1. Introduzione

1.1 Generalità

Nel passato, sotto il termine Elminti veniva raggruppato un insieme eterogeneo di animali o stadi di animali vermiformi che non sembravano possedere caratteri distintivi tali da farli comprendere in altri gruppi zoologici. Attualmente l'Organizzazione Mondiale della Sanità prende in considerazione gli Elminti che interessano la parassitologia umana distinguendo due gruppi di organismi differenti, appartenenti ai phyla Platyhelmintha e Nematoda. Del gruppo degli Elminti fa parte anche il phylum Acantocephala, in cui sono compresi organismi parassiti degli animali.

Il phylum Platyhelmintha è suddiviso nelle classi dei Turbellari - la gran parte a vita libera - dei Trematodi e dei Cestodi - parassiti dell'uomo e degli animali.

La presenza nelle acque degli stadi larvali infettivi di Trematodi è limitata dalla loro scarsa capacità di sopravvivenza nell'ambiente: poche ore se non incontrano l'ospite (spesso necessitano di un ospite intermedio e di uno definitivo) in cui compiono il loro ciclo vitale. L'uomo costituisce un ospite inadeguato. Anche recentemente in Europa, Stati Uniti, Australia, Nuova Zelanda e Giappone sono stati segnalati casi di patologie cutanee associate ad immersione in ambienti di acqua dolce dove erano contemporaneamente presenti gli stadi larvali natanti e gli ospiti specifici. In Italia evidenze epidemiologiche risalgono a trenta-quaranta anni fa. Rari casi sono stati riportati più di recente in acque lacustri (un caso nel 1993).

Cisti e uova di Cestodi hanno quale modo di trasmissione prevalente la via fecale-orale e alimentare.

Il phylum Nematoda è considerato uno dei gruppi di organismi più diffuso in natura: ne sono state descritte 12.000 specie, molte delle quali vivono nell'acqua dolce o marina, in acque termali o ad alta salinità. Altre hanno il loro habitat nel suolo o nella materia organica in decomposizione e alcune possono fare parte del benthos e del plancton marino. Circa 5.000 specie parassitano le piante e gli animali, ma la distribuzione e la diffusione dei parassiti (una dozzina di specie) che hanno un riscontro nella patologia umana è limitata, ad oggi, alla fascia tropicale e subtropicale interessando vaste aree del continente africano, asiatico e alcune zone dell'Europa nord-orientale.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la eventuale presenza di uova di elminti.

1.3 Principio del metodo

La procedura analitica prevede una fase di sedimentazione e una serie di centrifugazioni seguite da una flottazione e dall'evidenziazione delle uova al microscopio. La procedura non consente la determinazione a livello di specie.

Esiste la possibilità di utilizzare, durante la fase di flottazione, reagenti diversi. È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un reagente o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore purché vengano mantenute le caratteristiche di produttività del metodo.

È da tenere in conto che valori elevati di torbidità possono diminuire l'efficienza di recupero.

Con questa procedura è possibile ottenere una percentuale di recupero pari a circa il 70% quando la concentrazione delle uova è di 100 per litro.

1.4 *Campo di applicazione*

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

2. **Volume da analizzare**

Il volume da analizzare è pari a 1-10 litri per l'esame di acque superficiali, reflue grezze, ma per acque sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

3. **Strumentazione e vetreria**

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, è necessario disporre di:

- centrifuga a rotore basculante;
- coni Imhoff;
- contenitori da centrifuga da 50 mL con fondo conico;
- microscopio.

4. **Reattivi**

4.1 *Soluzione di Formaldeide al 10%*

<i>Composizione:</i>		
Formaldeide 37%	27	mL
Acqua distillata	73	mL

Miscelare in acqua distillata la formaldeide al 37% con le dovute precauzioni sotto cappa chimica.

4.2 *Soluzione di Lugol*

<i>Composizione:</i>		
I ₂	4	g
KI	6	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere i componenti nell'acqua distillata. Aggiungere al campione al momento del prelievo. Conservare al buio.

4.3 *Soluzione di sodio nitrato*

<i>Composizione:</i>		
NaNO ₃	60	g
Acqua distillata	100	mL

Preparare una soluzione satura di sodio nitrato sciogliendo il sodio nitrato in acqua distillata.

5. Procedura

5.1 Fissazione del campione

Fissare il campione con formaldeide (4.1) operando preferibilmente al momento del campionamento e con le dovute precauzioni.

5.2 1ª Sedimentazione

Aggiungere 1 mL di soluzione di Lugol (4.2) per ogni 100 mL di campione. Distribuire il campione, in base al volume da analizzare, in uno o più beaker o, preferibilmente in coni Imhoff. Lasciare sedimentare per tutta la notte e procedere allo svolgimento dell'analisi il giorno successivo.

5.3 Centrifugazione

Dopo la fase di sedimentazione eliminare il sovrantante e trasferire un massimo di 10 mL di "pellet" in tubi da centrifuga da 50 mL. Lavare le pareti del contenitore dove è avvenuta la sedimentazione con acqua distillata per raccogliere ogni eventuale residuo e aggiungerla al "pellet" nei tubi. Centrifugare per 10 minuti a 700 g e successivamente scartare il sovrantante.

5.4 Flottazione

Al "pellet" residuo aggiungere un volume (1:2) di una soluzione satura di NaNO_3 ($d=1,3$) (4.3) e centrifugare per 3 minuti a 1000 g. Ripetere l'intera procedura per un totale di tre volte e, ogni volta, rimuovere accuratamente il sovrantante ponendolo in beaker, o preferibilmente, in cono Imhoff contenente 1 L di acqua.

5.5 2ª Sedimentazione

Lasciare sedimentare nel recipiente per circa 12 ore. Successivamente eliminare accuratamente il sovrantante e trasferire il "pellet" in tubi da centrifuga. Lavare le pareti del contenitore dove è avvenuta la sedimentazione con acqua distillata per raccogliere ogni eventuale residuo e aggiungerla al "pellet" nei tubi. Centrifugare per 4 minuti a 1000 g.

6. Osservazione al microscopio

Dopo l'ultima centrifugazione raccogliere il "pellet" su un vetrino ed esaminare al microscopio a 100 ingrandimenti verificando la presenza di uova di Elminti.

7. Espressione dei risultati

Riportare il risultato come Presenza/Assenza di uova di Elminti nel volume esaminato.

8. Resoconto di prova

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

BIBLIOGRAFIA

SATCHWELL M.G. (1986): "An adaptation of concentration techniques for the enumeration of parasitic Helminth eggs from sewage sludge, *Wat. Res.*, **7**, 813-816.

TEICHNANN A. (1986): "Zur methodik des quantitativen nachweis von helminthenstation in kommunalen abwassern", *Angewandte Parasitologie*, **27**, 145-150.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1989): "*Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture*".

7110. Batteriofagi

1. Introduzione

1.1 Generalità

I batteriofagi strutturalmente sono costituiti da una molecola di acido nucleico protetta da un involucro proteico.

Similmente ai virus animali, possono moltiplicarsi esclusivamente all'interno della cellula ospite, metabolicamente attiva e competente.

La loro distribuzione nell'ambiente non ha ancora fornito dati ben precisi ma la loro presenza è stata individuata in tutti i mezzi ove è presente una forma di vita batterica. Ogni "habitat" presenta una popolazione fagica di batteri autoctoni ed una popolazione fagica proveniente da altri ambienti. Negli ambienti acquatici i fagi infettanti i batteri del genere *E. coli* (colifagi ed F-specifici) sono i più rappresentati e, dato l'interesse che essi ricoprono in qualità di indicatori potenziali di una contaminazione virale di origine fecale, sono stati i più studiati e ricercati. La loro distribuzione nel tratto digerente dell'uomo e degli animali è stata più volte studiata ed è stato dimostrato che il 23,5% di campioni di feci umane contiene fagi di *E. coli* con una concentrazione pari a 10^5 UFP per grammo di feci. Un altro batteriofago presente in grande quantità nel tratto intestinale è il fago specifico del *Bacteroides fragilis* (B 40-8), batterio anaerobio.

La capacità di sopravvivenza e di moltiplicazione dei fagi nell'ambiente è un aspetto importante; esso è in relazione alla presenza, in un determinato "habitat", del batterio ospite, dell'età fisiologica del batterio stesso e della densità rispettivamente del batterio ospite e del suo fago. Ciò è chiaramente valido per i fagi infettanti i batteri autoctoni; per i fagi specifici dei batteri alloctoni invece, la situazione è meno chiara. I colifagi somatici riescono a moltiplicarsi nell'ambiente in quanto riconoscono il loro recettore di attacco sulla superficie esterna del corpo batterico a temperature relativamente basse ($15^{\circ}\pm 45^{\circ}\text{C}$) quali quelle riscontrabili in un ambiente idrico; per i colifagi F-specifici (F-plus) invece la moltiplicazione nell'ambiente è possibile solo utilizzando come recettore il sex-pilus. La sintesi di questo recettore si verifica a temperature superiori a 30°C , ragion per cui, la moltiplicazione nell'ambiente di questi fagi è realizzabile soltanto se il loro batterio ospite ha sintetizzato precedentemente il sex-pilus nell'intestino degli omeotermi, prima di essere versato nel mezzo idrico.

I fagi che infettano il *Bacteroides fragilis*, infine, non sono in grado di moltiplicarsi nell'ambiente perchè il loro batterio-ospite è metabolicamente attivo soltanto in condizione di anaerobiosi ed in presenza di alcuni fattori di crescita specifici, condizioni che non sono riproducibili in un ambiente idrico.

La sopravvivenza dei batteriofagi nell'ambiente idrico è superiore a quella dei batteri autoctoni ed in particolare a quella dei batteri indicatori di contaminazione fecale. Allo stesso modo dei virus animali la durata della loro sopravvivenza dipende dalla presenza di sostanza organica nel mezzo e dalla loro associazione con le particelle solide, dalla temperatura, dalla loro esposizione ai raggi ultravioletti, dal pH, ecc.

Nel corso dell'ultimo decennio i batteriofagi sono stati proposti come indicatori di contaminazione virale dei mezzi idrici e anche come indicatori di efficacia dei processi di depurazione e disinfezione delle acque.

I colifagi possono essere isolati e quantificati con metodi semplici e poco costosi, i tempi di risposta sono più brevi che per gli enterovirus, alcuni colifagi sono più resistenti degli enterovirus all'inattivazione e alla disinfezione.

Alcuni Autori, in seguito a recenti studi, hanno proposto l'uso del fago specifico del *Bacteroides fragilis* come indicatore di contaminazione fecale in quanto specifico del tratto digerente umano.

1.2 Obiettivo

Il metodo analitico consente di valutare e quantificare la presenza di batteriofagi in un volume noto di acqua.

1.3 Principio del metodo

La procedura di analisi si basa sulla messa in evidenza della popolazione fagica mediante metodi qualitativi o quantitativi.

1.4 Campo di applicazione

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

2. Reattivi e terreni di coltura

2.1 Estratto di carne al 10%, pH 9,0

Composizione:

Estratto di carne	10	g
Acqua distillata pH 9,0±0,2	100	mL

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 (NaOH). Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C.

La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.2 Estratto di carne al 3% pH 7,2 e pH 9,5

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Acqua distillata	100	mL

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 (NaOH).

Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C.

La soluzione se conservata sterilmente può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.3 Soluzione di Formaldeide allo 0,1%

Composizione:

Formaldeide (soluzione al 37%)	1,35	mL
Acqua distillata	500	mL

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

2.4 Soluzione di Idrossido di sodio (NaOH) 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'utilizzo.

2.5 Tampone glicina 0,25 M pH 9,5

Composizione:

Glicina	18,76	g
Acqua distillata	1000	L
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 (NaOH).

Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C.

La soluzione se conservata sterilmente può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.6 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 per 15±1 minuti a 121±3°C e mantenere a circa +4°C. Utilizzare non oltre i 14 giorni.

2.7 Brodo Triptone doppio concentrato

Composizione:

Triptone	20	g
Destrosio	2	g
Cloruro di sodio	10	g
Acqua distillata	1	L
pH 7,0±0,2		

Sciogliere i costituenti in acqua distillata, sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C e mantenere a circa +4°C. Utilizzare non oltre i 14 giorni.

2.8 Agar triptone: primo strato

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

La miscela di terreno così composta non è reperibile in commercio; è possibile acquistare i singoli costituenti che verranno mescolati al momento della preparazione del terreno. Reidratare in acqua distillata i costituenti, secondo la formula sopra riportata, fino a completo scioglimento in agitazione. Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C, raffreddare a circa 50°C e distribuire in capsule Petri da 90 mm di diametro. Lasciare solidificare. Le piastre possono essere conservate per una settimana a circa +4°C.

2.9 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		

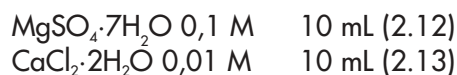
Preparare il terreno in piccoli matracci nella quantità sufficiente per l'analisi quotidiana e autoclavare per 15±1 minuti a 121±3°C. Mantenere il terreno a 55±1°C fino al momento dell'uso.

Aggiungere, prima della semina, acido nalidixico alla concentrazione di 100 mg/L per la ricerca dei colifagi somatici, oppure streptomicina e ampicillina, entrambi alla concentrazione di 0,015 g/L, per la ricerca dei fagi F-plus.

2.10 Soluzione tampone per fago

Composizione:		
Na ₂ HPO ₄	7	g
KH ₂ PO ₄	3	g
NaCl	5	g
Acqua distillata	1	L

Sciogliere i costituenti in acqua distillata e autoclavare a 121±3°C per 15±1 minuti. Lasciare raffreddare e aggiungere:



Queste soluzioni vanno preparate separatamente, autoclavate a 121±3°C per 15±1 minuti e conservate a circa +4°C per non oltre 6 mesi in condizioni ottimali.

2.11 Solfato di magnesio (MgSO₄·7H₂O) allo 0,1 M

Composizione:		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,46	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere la polvere in acqua fino alla completa dissoluzione, sterilizzare in autoclave per 15 ± 1 minuti a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ e conservare a circa $+4^\circ\text{C}$ per non oltre 6 mesi in condizioni ottimali.

2.12 Cloruro di calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) allo 0,01 M

Composizione:

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere la polvere in acqua fino alla completa dissoluzione, sterilizzare in autoclave per 15 ± 1 minuti a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ e conservare a circa $+4^\circ\text{C}$ per non oltre 6 mesi in condizioni ottimali.

2.13 Supplementi selettivi: antibiotici

Gli antibiotici sono disponibili in commercio in forma liofilizzata.

Preparare uno stock iniziale per ogni antibiotico e conservarlo a circa -20°C .

Lo "stock" si conserva non oltre i sei mesi in condizioni ottimali, suddiviso in aliquote.

2.13.1 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 circa -20°C .

2.13.2 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 circa -20°C in condizioni ottimali.

2.13.3 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 circa -20°C in condizioni ottimali.

2.13.4 Vancomicina: "stock" iniziale

Composizione:

Vancomicina	75	mg
Acqua distillata	10	mL

Sciogliere l'antibiotico fino alla completa dissoluzione; sterilizzare per filtrazione. Dividere in aliquote da 1 mL. Conservare a circa -20°C in condizioni ottimali.

2.13.5 Kanamicina: "stock" iniziale

<i>Composizione:</i>			
Kanamicina	1		g
Acqua distillata	10		mL

Sciogliere l'antibiotico fino alla completa dissoluzione; sterilizzare per filtrazione. Dividere in aliquote da 1 mL. Conservare a circa -20°C in condizioni ottimali.

2.14 Brodo di crescita del *Bacteroides fragilis* doppio concentrato

<i>Composizione:</i>			
Casitone	20		g
Peptone di carne	20		g
Estratto di lievito	4		g
Cloruro di sodio	10		g
L cisteina cloridrato	1		g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (0,05 g/mL)	2		g (2.16)
MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,12 g/mL)	2	mL	(2.17)
Glucosio	3,6		g
Acqua distillata	1		L

Dopo aver sciolto i costituenti in acqua distillata sterilizzare per 15±1 minuti a 121±3°C in autoclave, raffreddare a circa 50°C. Successivamente aggiungere sterilmente:

Emina 0,1%	20	mL (2.18)
Carbonato bisodico 1 M	50	mL (2.19)

Aggiustare sterilmente il pH a 7,0±0,2 con HCl 35% (circa 5-6 mL/L) senza superare il valore limite.

Il terreno, senza emina, può essere conservato a circa +4°C per una settimana in condizioni ottimali.

È consigliabile preparare la quantità di terreno da usare per l'analisi giornaliera senza conservarlo successivamente.

2.15 Cloruro di Calcio biidrato (CaCl₂·2H₂O 0,05 g/mL)

<i>Composizione:</i>			
CaCl ₂ ·2H ₂ O	5		g
Acqua distillata	100		mL

Sciogliere la polvere fino a completa dissoluzione con l'aiuto di un agitatore magnetico. Autoclavare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C non oltre sei mesi in condizioni ottimali.

2.16 Solfato di magnesio eptaidrato MgSO₄·7H₂O (0,12 g/mL)

<i>Composizione:</i>			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	12		g
Acqua distillata	100		mL

Sciogliere la polvere fino a completa dissoluzione con l'aiuto di un agitatore magnetico. Autoclavare a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare a circa $+4^\circ\text{C}$ per non oltre sei mesi.

2.17 Emina allo 0,1%

Composizione:			
NaOH	0,02	g	
Emina	0,1	g	
Acqua distillata	100	mL	

Sciogliere su agitatore magnetico NaOH in acqua fino a completa dissoluzione (15 minuti circa), aggiungere l'emina e lasciare in agitazione magnetica per circa 2 ore fino a completa dissoluzione.

Sterilizzare per filtrazione (porosità nominale $0,22 \mu\text{m}$). Conservare a temperatura ambiente per non oltre i sei mesi in condizioni ottimali.

2.18 Carbonato bisodico (Na_2CO_3) 1 M

Composizione:			
Na_2CO_3	106,0	g	
Acqua distillata	1	L	

Sciogliere la polvere in acqua fino a completa dissoluzione e sterilizzare per filtrazione (porosità nominale $0,22 \mu\text{m}$). Conservare a temperatura ambiente per non oltre sei mesi in condizioni ottimali.

2.19 Brodo di crescita del *Bacteroides fragilis*

Composizione:			
Casitone	10	g	
Peptone di carne	10	g	
Estratto di lievito	2	g	
Cloruro di sodio	5	g	
L-cisteina monoidrato	0,5	g	
Glucosio	1,8	g	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	mL	(2.16)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,12 g/mL)	1	mL	(2.17)
Acqua distillata	1	L	

Dopo aver sciolto i costituenti in acqua distillata sterilizzare per 15 ± 1 minuti a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ in autoclave e raffreddare a circa 50°C . Successivamente aggiungere sterilmente:

Emina 0,1%	10	mL (2.18)
Na_2CO_3 1 M	25	mL (2.19)

Aggiustare sterilmente il pH a $7,0 \pm 0,2$ con HCl 35% (circa 2-3 mL/L).

Il terreno, senza emina, può essere conservato a circa $+4^\circ\text{C}$ per non più di una settimana in condizioni ottimali. È consigliabile preparare la quantità di terreno da usare per l'analisi giornaliera senza conservarlo successivamente.

2.20 Terreno di isolamento primo strato

Composizione:

Agar sangue base n° 2	40	g	
L-cisteina monoidrato	0,5	g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O (0,05g/mL)	1	mL	(2.16)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	mL	(2.17)
Acqua distillata	1	L	

Sciogliere i costituenti in acqua distillata fino a completo scioglimento. Autoclavare per 15±1 minuti a 121±3°C. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Il terreno può essere conservato a circa +4°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

2.21 Agar molle secondo strato

Composizione:

Casitone	10	g	
Peptone di carne	10	g	
Estratto di lievito	2	g	
Cloruro di sodio	5	g	
L-cisteina monoidrato	0,5	g	
Glucosio	1,8	g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O (0,05 g/mL)	1	mL	(2.16)
MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,12 g/mL)	1	mL	(2.17)
Agar	7	g	
Acqua distillata	1	L	

Dopo aver sciolto i costituenti in acqua distillata sterilizzare per 15±1 minuti a 121±3°C in autoclave e raffreddare a circa 55±1°C. Successivamente aggiungere sterilmente:

Emina 0,1%	10	mL	(2.18)
Na ₂ CO ₃ 1 M	25	mL	(2.19)

Aggiustare sterilmente il pH a 7,0±0,2 con HCl 35% (circa 2-3 mL/L).

Mantenere il terreno a 55±1°C fino al momento dell'uso.

È consigliabile preparare la quantità di terreno da usare per l'analisi giornaliera senza conservarlo successivamente.

Per evitare contaminazioni è bene aggiungere al terreno 100 mg/mL di solfato di kanamicina (2.14.5) e 7,5 mg/mL di Vancomicina (2.14.4). Il batterio rivelatore raccomandato è resistente ad entrambi gli antibiotici.

3. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio è necessario disporre di:

- agitatore magnetico;
- apparato per filtrazione con pompa da vuoto;
- apparato per ultrafiltrazione;
- bagno termostato;
- barrette magnetiche;
- bottiglie sterili per prelievo;
- capsule Petri da 90 mm di diametro;
- membrane filtranti per decontaminazione (low binding protein);
- membrane filtranti per recupero fagi;
- pipette automatiche;

- provette sterili;
- sistema completo per incubazione in anaerobiosi;
- termostato regolabile;
- "vortex".

4. Procedura

La ricerca dei batteriofagi in campioni di acque reflue richiede una serie di operazioni, così come per gli enterovirus, che devono essere adattate al tipo di fago che si intende ricercare. Benché la quantità dei fagi in un ambiente idrico è di gran lunga superiore a quella degli enterovirus, in alcuni tipi di campioni è necessaria una concentrazione di essi.

La maggior parte dei metodi utilizzati per concentrarli si basa sul principio dell'adsorbimento su diversi materiali così come avviene per i virus animali; in una seconda fase si provvede ad eluire in un piccolo volume i fagi adesi al materiale adsorbente. È importante tenere conto di alcune caratteristiche dei fagi, in particolare la loro sensibilità al pH. Alcuni colifagi presenti nell'acqua sono inattivati a pH 11,5; il fago specifico del *B. fragilis* è sensibile invece a valori di pH vicini a 3,0 che generalmente vengono impiegati in alcuni metodi di concentrazione.

Per questi motivi è bene utilizzare dei metodi che non prevedano l'uso di eluenti con valori di pH estremi.

4.1 Volume da analizzare

La diversa natura dei campioni ambientali impone delle differenze nella scelta dei volumi da sottoporre ad analisi, volumi che devono tenere conto del grado di inquinamento, accertato o presunto, della tipologia dell'acqua e della destinazione d'uso. Per acque reflue, i volumi variano da pochi mL a 2-3 L in base al trattamento depurativo eventualmente subito (es. acque reflue in entrata e in uscita dagli impianti di depurazione). Per le acque superficiali, i volumi da analizzare dovranno essere necessariamente più elevati.

4.2 Concentrazione per adsorbimento-eluzione

Questo metodo consente di concentrare i fagi a un volume massimo di 2-3 litri di acqua in un volume finale di eluente pari a 3-5 mL.

4.2.1 Filtri elettronegativi

Questo modello di membrane filtranti presenta una superficie a carica elettrica negativa. A valori di pH prossimi alla neutralità le particelle virali vengono respinte mentre, riducendo i valori di pH intorno a 3,5 si ottiene una inversione della carica elettrica superficiale dei virus che ne permette il loro adsorbimento. Aggiungendo cationi bi- o tri-valenti al campione da concentrare, è possibile migliorare la capacità adsorbente del filtro. Questa tecnica, largamente utilizzata per il recupero degli enterovirus da campioni ambientali, può essere applicata per il recupero dei batteriofagi sebbene il rendimento sia minore; molti fagi infatti sono rapidamente inattivati dai bassi valori di pH. Adottando dei valori di pH intorno a 3,8-4,0 e controllando accuratamente il valore raggiunto durante le singole fasi della procedura di recupero, si ottengono risultati più soddisfacenti. Un rendimento maggiore è stato dimostrato per valori di pH intorno a 6,0 ed in presenza di ioni Mg^{2+} ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,2 M). Dopo aver filtrato il campione per pressione positiva attraverso il filtro, si procede alla eluzione con un piccolo volume (da 3 a 5 mL) di una soluzione ad alta concentrazione di proteine (3% di estratto di carne) con un valore di pH intorno a 9,0 (2.2). Si neutralizza velocemente l'eluato con HCl 1 N ed il concentrato così ottenuto è pronto per essere analizzato.

4.2.2 Filtri elettropositivi

L'adsorbimento dei fagi ai filtri elettropositivi è ottimo mentre la loro completa eluizione risulta piuttosto difficile. I migliori risultati si ottengono adottando come eluente una soluzione di estratto di carne al 3% con un valore di pH compreso tra 7.0 e 9.0.

Una delle metodiche già descritte in letteratura prevede l'uso di filtri elettropositivi del tipo VI-ROSORB 1 MDS. In commercio è comunque possibile reperire altri tipi di filtri a carica superficiale modificata.

Il campione viene filtrato per pressione positiva attraverso un pacchetto di tre filtri 1 MDS. I fagi adsorbiti vengono eluiti con 20 mL di estratto di carne al 10% pH 9.0 (2.1), e l'eluato raccolto, neutralizzato con HCl 1N. L'eluato viene mescolato con due volumi di una soluzione satura di ammonio e centrifugato a 14500g/20'/+4°C. Il "pellet" è quindi risospeso in 2 mL di acqua distillata sterile.

4.2.3 Altri filtri

Si tratta di membrane filtranti di materiale inorganico con diametro di 47 mm e con porosità di 0,1 o 0,2 µm del tipo ANODISC™ che non presentano cariche elettriche di superficie. Consentono di concentrare il campione in condizioni di pH neutro e per questo motivo sono particolarmente consigliati per il recupero dei fagi B40-8.

4.3 Metodo di concentrazione per Ultrafiltrazione a Flusso tangenziale

L'ultrafiltrazione è un processo di separazione delle particelle in funzione del solo peso molecolare; esistono diverse membrane e cartucce con tagli molecolari ("nominal molecular weight limit") da 1.000 sino a 1.000.000 di dalton. La funzione della membrana 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 es. i virus. I batteriofagi in particolare 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. Attualmente in commercio è possibile reperire due tipi di membrane: cellulosa rigenerata e polisulfone.

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

Per migliorare il rendimento (recupero) della membrana o cartuccia è preferibile pretrattare con estratto di carne al 3% pH 7,0±0,2 (2.2) prevenendo così l'adsorbimento aspecifico dei fagi. La procedura analitica è di seguito descritta:

- montare l'ultrafiltro secondo le istruzioni della casa produttrice;
- pretrattare il sistema con estratto di carne a pH 7,0±0,2 (2.2) 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 dell'ultrafiltro. Svuotare il sistema completamente e raccogliere il campione;
- lavare l'ultrafiltro con una soluzione di estratto di carne al 3% pH 9,5±0,2 (2.2) 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 (HCl).

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

A fine concentrazione:

- lavare l'ultrafiltro con 1-2 L di acqua distillata;

- far circolare in continuo per almeno 15 minuti una soluzione di NaOH 0,1 N (2.5);
- lavare l'ultrafiltro con 2-3 L di acqua distillata.

A questo punto l'ultrafiltro può essere utilizzato per un nuovo campione o conservato per successive analisi.

4.4 *Mantenimento e conservazione degli ultrafiltri*

Le membrane o cartucce per ultrafiltrazione a flusso tangenziale possono essere utilizzate a lungo e per diversi campioni se adeguatamente rigenerate e conservate e come di seguito descritto:

- lavare l'ultrafiltro con 1-2 L di acqua distillata;
- far circolare in continuo per almeno 15 minuti una soluzione di NaOH 0,1 N (2.5);
- lavare l'ultrafiltro con 2-3 L di acqua distillata;
- far circolare in continuo una soluzione di formaldeide allo 0,1% (2.4);
- spegnere la pompa ed estrarre l'ultrafiltro cercando di conservare quanta più formaldeide possibile all'interno dell'ultrafiltro stesso;
- mantenerlo a circa +4°C.

5. **Rivelazione dei diversi tipi di batteriofagi**

Tutti i campioni di provenienza ambientale contengono consorzi batterici propri che possono in qualche modo interferire con la rivelazione dei batteriofagi; pertanto è necessario inattivare o allontanare tale popolazione microbica prima di effettuare la messa in evidenza dei fagi.

La decontaminazione può essere effettuata con metodi diretti che prevedono o la filtrazione su membrane di nitrato di cellulosa (porosità nominale 0,22 µm) preventivamente trattate con estratto di carne al 3% pH 7,2 (2.2) oppure trattando il campione con 1/3 del suo volume di cloroformio, agitando energicamente per 10 minuti ed allontanando la fase organica per centrifugazione. Quest'ultimo trattamento, pur distruggendo la maggior parte dei batteri, provoca comunque un'inattivazione parziale dei fagi. I metodi indiretti, invece, possono essere attuati nella fase di rivelazione dei fagi aggiungendo al mezzo di coltura un antibiotico in grado di inattivare i batteri contaminanti ma non la crescita del batterio rivelatore che presenta plasmidi di resistenza specifici.

Per quanto riguarda l'evidenziazione dei fagi i metodi possono essere sia qualitativi che quantitativi.

Il classico metodo utilizzato per stabilire la presenza dei fagi (metodo qualitativo) si basa su una fase di arricchimento del fago e sua successiva messa in evidenza. Ad un volume noto di campione da analizzare si aggiunge un eguale volume di terreno di coltura idoneo nel quale è stato fatto precedentemente crescere il batterio indicatore. Dopo incubazione, al fine di favorire la moltiplicazione dei fagi presenti, una piccola quantità della coltura viene decontaminata e sottoposta al test di rivelazione.

La ricerca quantitativa delle particelle fagiche in un campione ambientale può essere effettuata con due diversi metodi: il metodo delle placche di lisi e il metodo dell'MPN ("Most Probable Number").

La tecnica delle placche di lisi è quella più usata in laboratorio e deriva dal metodo del doppio strato di agar.

Si mescola un adeguato volume del campione da analizzare con dell'agar molle, mantenuto nella fase liquida; si aggiunge la sospensione batterica indicatrice e, dopo leggera agitazione, il "mix" viene versato su uno strato di terreno agarizzato precedentemente fatto solidificare in capsule Petri.

Dopo l'incubazione si osservano e si enumerano le placche di lisi: ognuna di esse corrisponde ad una particella di fago infettivo (Unità Formanti Placca-UFP).

6. Colifagi somatici

Il batterio indicatore raccomandato è *E. coli* C ATCC 13706; è possibile utilizzare un ceppo derivato da esso purché resistente all'acido nalidixico. L'antibiotico viene aggiunto al terreno alla concentrazione finale di 100 mg/mL, partendo da uno "stock" precedentemente preparato e sterilizzato per filtrazione (2.14.1).

Al terreno di coltura può essere aggiunto agar-agar nella proporzione variabile secondo l'uso: agar del primo strato 1,5% (2.9) e agar secondo strato (o molle) 0,5% (2.10).

6.1 Procedura dell'analisi qualitativa

In un adeguato recipiente sterile mescolare:

- un volume di campione (a);
- un egual volume di terreno liquido doppio concentrato (b) (2.7);
- un volume pari al 12% di a+b della coltura del batterio rivelatore in fase esponenziale di crescita (D.O.=0,3 a 620 nm).

Incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per 16-18 ore. Prelevare una aliquota (circa 1 mL) della coltura ottenuta e decontaminarla con cloroformio. Mescolare 3 mL di agar molle (terreno di crescita con l'aggiunta di 0,5% di agar) (2.10) mantenuto a circa 45°C con 0,2 mL di una brodocoltura del batterio rivelatore in fase esponenziale di crescita. Versare in una capsula di Petri contenente un primo strato agarizzato del terreno di crescita (1,5% di agar) (2.9). Dopo solidificazione deporre una goccia della coltura decontaminata sulla superficie dell'agar. Lasciare asciugare e incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$ per almeno 8 ore. In caso di presenza di fago si osserverà un'area di lisi intorno alla goccia depositata.

6.2 Espressione dei risultati

Il risultato è espresso come presenza/assenza in un determinato volume di campione analizzato.

6.3 Procedura dell'analisi quantitativa

In un tubo sterile mescolare:

- 2,5 mL di agar molle (0,5% di agar) mantenuto a 45°C (2.10);
- 0,5 mL della coltura del batterio rivelatore in fase esponenziale di crescita (D.O.=0,3 a 620 nm);
- 100 mL del campione da analizzare precedentemente decontaminato per filtrazione.

Mescolare e versare su un primo strato di terreno di crescita fatto solidificare in una capsula Petri (1,5% agar) (2.9). Dopo solidificazione incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$. Le placche sono già visibili dopo 6-8 ore di permanenza a $36\pm 1^\circ\text{C}$.

6.4 Espressione dei risultati

Contare le placche di lisi dopo 18-20 ore di incubazione. Esprimere il risultato in UFP (Unità Formanti Placca) in un determinato volume di campione analizzato.

7. Colifagi f- specifici (f-plus)

Il batterio rivelatore, raccomandato per questa determinazione, deriva da *E. coli* K 12 (Hfr) che presenta i plasmidi di resistenza per la streptomicina e l'ampicillina.

Il terreno di crescita consigliato è identico a quello descritto per i colifagi somatici. È necessario aggiungere all'agar molle (2.10) i due antibiotici prima detti alla concentrazione di 0,015 g/L per entrambi (2.14.2-2.14.3).

Le fasi operative (analisi qualitativa e quantitativa) sono uguali a quelle descritte per i colifagi somatici (6.1-6.4)

8. B40-8, Fago del *Bacteroides fragilis*

Il batterio rivelatore consigliato è il *Bacteroides fragilis* HSP 40.

Per evitare le contaminazioni è consigliabile aggiungere al terreno 100 mg per mL di solfato di Kanamicina (2.14.5) e 7,5 mg per mL di Vancomicina (2.14.4). Il batterio raccomandato è resistente ad entrambi gli antibiotici.

È necessario lavorare in condizioni di assoluta anaerobiosi date le caratteristiche anaerobiche del batterio. Per l'isolamento del fago su terreno agarizzato si utilizzano per l'incubazione delle giare per anaerobiosi; per le colture in terreno liquido invece si possono utilizzare provette con tappo a vite completamente riempite di terreno liquido.

8.1 Procedura dell'analisi qualitativa

In un recipiente sterile mescolare:

- un volume di campione da analizzare (a);
- un egual volume di terreno liquido doppio concentrato (b) (2.15);
- un volume pari al 12% a+b della coltura del batterio rivelatore in fase esponenziale di crescita (D.O.=0,3 a 620 nm). Incubare a $36\pm 1^\circ\text{C}$ in condizioni di anaerobiosi per 18 ore circa.

Dopo l'incubazione una piccola quantità della coltura, preventivamente decontaminata con cloroformio, viene sottoposta al "test" di conferma come di seguito descritto.

In una capsula Petri, contenente un primo strato di terreno agarizzato (terreno di crescita all'1,5% di agar) (2.21), versare 3 mL di agar molle (terreno di crescita allo 0,5% di agar) (2.22) mantenuto a 45°C mescolato con 0,2 mL di una brodocoltura in fase esponenziale di crescita del batterio rivelatore. Lasciare solidificare e deporre una goccia della coltura in esame, precedentemente decontaminata, sulla superficie dell'agar; incubare per almeno 8 ore a $36\pm 1^\circ\text{C}$ in condizioni di anaerobiosi. In presenza di fago si osserverà un'area di lisi intorno alla goccia depositata.

8.2 Espressione dei risultati

Esprimere il risultato come presenza/assenza di batteriofagi in un determinato volume di campione.

8.3 Procedura dell'analisi quantitativa

La procedura è uguale a quella già descritta per i colifagi e gli F-specifici (F-plus) (6.3) eccetto che per l'incubazione che è effettuata in giare per anaerobiosi.

8.4 Espressione dei risultati

Contare le placche di lisi dopo 18-20 ore di incubazione. Esprimere il risultato in UFP (Unità Formanti Placca) in un determinato volume di campione analizzato.

BIBLIOGRAFIA

DEBARTOLOMEIS J. & CABELLI V.J. (1991): "Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of F-male-specific bacteriophages", *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1301.

DIVIZIA M., DONIA D., GABRIELI R., RUSCIO V. & PANÀ A. (1997): "Valutazioni relative ad un nuovo sistema di ultrafiltrazione per la concentrazione di enterovirus e batteriofagi", *Igiene e Sanità Pubblica*, **53**, 315.

DONIA D., DIVIZIA M. & PANÀ A. (1998): "Analysis of concentration methods for bacteriophages", *Igiene Moderna*, **109**, 1.

DONIA D., DIVIZIA M., PANÀ A., GABRIELI R., GASBARRO M., CAPUANI L. & MORELLI A.L. (1999): "Presence of bacteriophages in different stages of wastewater treatment", *Igiene Moderna*, **111**, 1-13.

GABRIELI R., DIVIZIA M., DONIA D., RUSCIO V., BONADONNA L., DIOTALLEVI C., VILLA L., MANZONE G. & PANÀ A.: (1997): "Evaluation of the wastewater treatment plant of Rome airport", *Water Sci. Tech.*, **35**, 193-196.

HAVELAAR A.H. (1993): "Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment", *ASM News*, **59**, 614.

TARTERA C., ARAUJO R., MICHEL T. & JOFRE J. (1992): "Culture and decontamination methods affecting enumeration of phages infecting *Bacteroides fragilis* in sewage", *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 2670.

TARTERA C. & JOFRE J. (1987): "Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters", *Applied and Environmental Microbiology*, **53**, 1632.

7120. Enterovirus

1. Introduzione

1.1 Generalità

Il termine enterovirus, che comprende Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus e il virus dell'epatite A, non deve essere confuso con il termine virus enterici che, diversamente, comprende la totalità dei virus reperibili nell'ambiente. I virus enterici sono eliminati dall'uomo per via fecale e possono, mediante acque ed alimenti contaminati, infettare soggetti recettivi. I virus enterici, appartengono a 6-8 famiglie differenti mentre nel complesso sono oltre 100 i sierotipi responsabili di malattia nell'uomo; sono tutti parassiti endocellulari ovvero necessitano di una linea cellulare su cui moltiplicarsi. Dal punto di vista analitico al momento non esiste una linea cellulare in grado di favorire la moltiplicazione di tutti i virus enterici e mentre alcuni sono capaci di moltiplicarsi su diverse linee cellulari (Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus), altri si moltiplicano con notevole difficoltà (virus dell'epatite A, Rotavirus). Esiste un terzo gruppo di virus che non è in grado di moltiplicarsi sulle linee cellulari attualmente in uso nei laboratori (Astrovirus, virus dell'epatite E, Adenovirus 40-41).

L'analisi virologica pone una serie di problemi, diversi rispetto a quelli che si incontrano per l'analisi batteriologica, che si identificano in: a) volumi da analizzare, b) procedure da adottare per la concentrazione dei campioni, c) isolamento su sistemi cellulari ed identificazione dei virus isolati.

I volumi che vengono utilizzati nell'analisi virologica delle acque sono nettamente superiori a quelli utilizzati nell'analisi batteriologica: pochi litri per le acque reflue, decine-centinaia di litri per le acque superficiali, sino a mille ed oltre litri per le acque potabili. È evidente che campioni di tali dimensioni non possono essere trasportati in laboratorio ma necessariamente si deve procedere ad una concentrazione su campo (concentrazione primaria) e successiva eluzione della membrana e/o cartuccia in laboratorio (concentrazione secondaria). Le stesse metodiche da adottare (filtrazione su membrane piane a carica superficiale elettropositiva o elettronegativa, ultrafiltrazione, ecc.) dipendono strettamente, oltre che dal tipo di acque da analizzare, anche dalle personali esperienze. L'isolamento su sistemi cellulari, per quei virus di cui è nota una linea cellulare suscettibile, presenta problemi legati alla necessità di diluire il campione al fine di ridurre la tossicità, alla necessità di usare più linee cellulari a seconda dei virus che si intendono ricercare, ecc. In ultimo, merita particolare attenzione il problema legato all'isolamento ed identificazione dei virus eventualmente presenti. Le metodiche classiche di sieroneutralizzazione con antisieri specifici, "test" immunoenzimatici 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).

Al momento lo svolgimento dell'analisi virologica delle acque è richiesto per il controllo delle acque di balneazione (assenza di enterovirus in 10 litri), degli escavi di fondali marini destinati al ripascimento di litorali e delle acque potabili tra i parametri occasionali C4 del DPR 236/88.

1.2 Obiettivo

I metodi di seguito descritti consentono di valutare la presenza di enterovirus in un volume noto di acqua.

1.3 Principio del metodo

Le procedure descritte permettono di determinare la presenza di virus enterici in un volume noto di acqua con tecniche quantitative (Unità Formanti Placche per volume o UFP/volume) e qualitative (presenza/assenza) tramite fasi di concentrazione, eluizione e identificazione.

1.4 Campo di applicazione

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

2. Reattivi e terreni di coltura

2.1 Sodio tiosolfato

Composizione:

Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	0,5	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere con barretta magnetica e sterilizzare per filtrazione. La soluzione di sodio tiosolfato va aggiunto alla concentrazione finale di 50 mg/L.

2.2 Estratto di carne al 3% pH 7,2 (2.2a) e pH 9,5 (2.2b)

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Acqua distillata	100	mL

Agitare vigorosamente con barretta magnetica. Portare il pH al valore desiderato con aggiunta di idrossido di sodio o acido cloridrico, sterilizzare in autoclave (121±3°C per 15±1 minuti).

La soluzione se conservata sterilmente può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.3 Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 0,1M

Composizione:

NaOH	0,4	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere l'idrossido di sodio in acqua su agitatore magnetico.

2.4 Soluzione di acido cloridrico (HCl) 0,1 M

Composizione:

Formaldeide	13,5	mL
Acqua distillata	500	mL

Miscelare l'acido cloridrico con acqua.

2.5 Soluzione di Formaldeide allo 0,1%

Composizione:

Formaldeide	13,5	ml
Acqua distillata	500	ml

Preparare al momento dell'uso con le dovute precauzioni e sotto cappa chimica e scartare dopo l'utilizzo.

2.6 Soluzione salina fosfatata con o senza Calcio e Magnesio (PBS)

In commercio esistono polveri premiscelate, con o senza calcio e magnesio, a basso costo. Sciogliere la polvere in acqua ultrapura secondo quanto riportato dalla casa produttrice e portare il pH a $7,2 \pm 0,2$ con NaOH 0,1 M o HCl 0,1 M. Sterilizzare in autoclave per 15 ± 1 minuti a $121 \pm 3^\circ\text{C}$. Prima dell'uso diluire 1:10 con acqua distillata sterile.

2.7 Soluzione fosfato di sodio bibasico anidro (Na_2HPO_4) allo 0,15 M pH 7,2

Composizione:

Fosfato di sodio bibasico anidro	2,4	g
Acqua ultrapura	100	ml

Sciogliere la soluzione utilizzando una barretta magnetica e sterilizzare in autoclave ($121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti). La soluzione, se conservata sterilmente in condizioni ottimali, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.8 Soluzione di polietilenglicol 6000 (PEG) al 50% (p/v)

Composizione:

Soluzione salina fosfatata senza calcio e magnesio (2.6)	90	ml
Cloruro di sodio (NaCl)	12	g
PEG 6000	80	g

Portare a 160 mL di volume totale con PBS senza calcio e magnesio. Aggiungere un magnete alla soluzione di PEG al 50%. Sterilizzare in autoclave (15 ± 1 minuti a $121 \pm 3^\circ\text{C}$). Una volta prelevata la soluzione dall'autoclave, mettere ad agitare per diverse ore (od anche per tutta la notte) finché la soluzione non diviene limpida. La soluzione, se conservata sterilmente in condizioni ottimali, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.9 Agar all'1,8%

Composizione:

Agar per colture cellulari	1,8	g
Acqua ultrapura	100	ml

Sterilizzare in autoclave ($121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti). Può essere conservato a circa $+4^\circ\text{C}$ per non oltre 6 mesi in condizioni ottimali. Se l'agar è troppo vecchio si può notare una certa difficoltà a solidificare.

2.10 Soluzione di 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 ($121\pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti). 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.

2.11 "Pool" di antibiotici

Composizione:		
Kanamicina	0,5	g
Streptomicina	6	g
Penicillina	5 milioni	di Unità
Micostatin	160.000	di Unità
Acqua ultrapura	50	mL

La composizione che viene indicata è una miscela ricca che può essere variata secondo le necessità, ad esempio aggiungendo antimicoplasmici in caso di presunta o accertata contaminazione delle linee cellulari.

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 circa -20°C ed utilizzare non oltre i 6 mesi.

2.12 Terreni per colture cellulari

I terreni per colture cellulari variano notevolmente per qualità, composizione di base ed aggiunta di fattori nutritivi per determinate linee cellulari, ad esempio amminoacidi non essenziali. Si rimanda pertanto agli appositi manuali. L'allestimento, la preparazione ed il mantenimento delle linee cellulari è un processo complesso che richiede un necessario periodo di addestramento in laboratori specializzati.

3. Strumentazione e vetreria di base

Oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio sono necessari:

- apparecchi per la produzione di acqua ultrapura;
- apparecchio per la produzione di acqua ultrapura per colture cellulari;
- bagnomaria;
- cappe a flusso laminare tipo "biohazard";
- centrifughe refrigerate a 6.000 rpm e 20.000 rpm;
- congelatori -20°C e -80°C ;
- contenitori per azoto liquido;
- microscopio rovesciato;
- sistema di filtrazione per membrane piane di diverso diametro e relativa pompa da vuoto;
- sistema di ultrafiltrazione;
- termostati.

4. Procedura di campionamento

Nel caso di volumi limitati (pochi litri), il campione può essere raccolto in taniche sterili, trasportato in laboratorio nel più breve tempo possibile e in condizioni refrigerate. Il campione deve essere concentrato al suo arrivo in laboratorio o conservato a circa +4°C sino al momento dell'esame (massimo 24 ore). Nel caso di volumi troppo grandi, non adatti al trasporto in laboratorio, si può provvedere ad una concentrazione preliminare direttamente su campo e trasportare in laboratorio, in condizioni refrigerate, la membrana o cartuccia utilizzata. La presenza di cloro nelle acque non costituisce un problema nell'analisi virologica per la maggiore resistenza dei virus all'inattivazione sia nei confronti dei disinfettanti naturali sia artificiali. In considerazione dei volumi, spesso elevati, da analizzare, è necessario, eventualmente, per neutralizzare il cloro, utilizzare sistemi ad iniezione estremamente complessi e costosi. Nei casi in cui i volumi siano maneggiabili, e dove la presenza di cloro è accertata o sospetta, si può aggiungere sodio tiosolfato alla concentrazione di 50 mg/L di campione (2.1).

Nel caso di acque reflue o troppo torbide che potrebbero causare l'immediato intasamento delle membrane o cartucce è bene prefiltrare il campione attraverso alcuni strati di garza sterile.

5. Procedura di filtrazione del campione

In letteratura sono riportate numerose metodiche di concentrazione-eluzione del campione. Alcune sono state abbandonate nel corso degli anni perché troppo laboriose e di scarso recupero.

Nel complesso i metodi più comunemente usati sono:

- filtrazione su membrane piane o cartuccia a carica superficiale elettronegativa od elettropositiva;
- ultrafiltrazione con membrane o cartucce a porosità nota. In commercio esistono diversi tipi e modelli con porosità nominale da 1.000 a 1.000.000 daltons.

I metodi riportati di seguito sono frutto delle informazioni presenti in letteratura e sperimentati sia su campo sia in laboratorio. I metodi possono essere modificati ed adattati alle specifiche esigenze, ma nel caso devono essere adeguatamente valutati in prove sperimentali di laboratorio utilizzando virus a titolo noto. Lo stesso eluente utilizzato per favorire il distacco del virus dal supporto solido può essere variato secondo le proprie necessità (ad esempio, eluenti con pH troppo elevato possono inattivare i virus eventualmente presenti; soluzioni proteiche sono preferibili in caso di precipitazione acida o con PEG 6000).

6. Procedura di concentrazione primaria

Per questa fase possono essere utilizzati diversi sistemi ma le membrane elettronegative, così come le cartucce, 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÷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 stesso. Recentemente sono state prodotte membrane piane e cartucce a carica superficiale elettropositiva che operano in un campo di pH estremamente ampio, non necessitano di preacidificazione ed aggiunta di sali, e possono essere collegate ad una pompa per la filtrazione del campione direttamente su campo.

Montare la cartuccia e/o membrana a carica superficiale elettropositiva nell'apposito supporto e collegare direttamente il contenitore al rubinetto di prelievo o alla pompa.

Regolare il flusso d'acqua in uscita, in base alle indicazioni della casa produttrice le membrane e/o cartucce, applicando un regolatore del flusso idrico in entrata. In uscita è consi-

gliabile applicare un contaltri. Dopo il prelievo, mettere la cartuccia e/o membrana in una busta di plastica ed etichettarla indicando luogo, data del prelievo e il volume filtrato. Porre la cartuccia in una borsa termica o in frigorifero portatile sino al ritorno in laboratorio. In laboratorio è preferibile eluire la cartuccia e/o membrana immediatamente o comunque entro le 24 h conservandola a circa +4°C.

6.1 Fase in laboratorio

Al fine di ridurre il volume da seminare su colture cellulari, che deve essere estremamente ridotto, è necessario procedere ad una seconda fase di concentrazione che può differenziarsi secondo i virus che si intendono ricercare o dell'eluente utilizzato per eluire la cartuccia e/o membrana.

6.2 Eluizione del virus adsorbito alla cartuccia e/o membrana

Per eluire correttamente una cartuccia da 10 pollici sono necessari 1,2-1,5 L di eluente (2.2b) in ricircolo continuo con l'ausilio di una pompa da laboratorio.

In breve: collegare l'uscita della pompa all'entrata del contenitore per cartucce. 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.

Nel caso di membrane piane da 142 mm utilizzare 90 mL di eluente facendolo passare lentamente goccia a goccia.

Neutralizzare l'eluato con acido cloridrico (HCl) (2.4) prestando attenzione che il pH sia intorno a $7,0 \pm 0,2$. L'acidificazione eccessiva dell'eluato, specie nel caso contenga estratto di carne, determinerebbe una precipitazione delle proteine ed un'inattivazione dei virus eventualmente presenti.

7. Procedura di concentrazione secondaria

La stessa metodica descritta nella prima fase di concentrazione (cartuccia o membrana elettropositiva) può essere anche utilizzata nella seconda fase, utilizzando membrane o cartucce di superficie inferiore. 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.

7.1 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 dalton 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 trattentate, 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. Nel caso di acque torbide è assolutamente indispensabile prefiltrare il campione attraverso diversi strati di garza sterile al fine di eliminare il particolato più grossolano, o utilizzando appositi prefiltri

a basso adsorbimento proteico. L'ultrafiltrazione può essere utilizzata sia come metodo di concentrazione primaria che secondaria.

7.1.1 Preparazione del campione

Il campione non necessita di pretrattamenti sebbene, per migliorare il rendimento della membrana e/o cartuccia (recupero), è preferibile pretrattarla con estratto di carne al 3%, pH $7,2 \pm 0,2$ (2.2a) prevenendo così l'adsorbimento aspecifico dei virus.

7.1.2 Concentrazione

- montare la membrana e/o cartuccia secondo le istruzioni della casa produttrice;
- lavare la membrana e/o cartuccia con 5-10 L di acqua distillata al fine di allontanare il liquido conservante, in genere formaldeide allo 0,1% (2.5);
- pretrattare il sistema con estratto di carne a pH $7,2 \pm 0,2$ (2.2a) facendolo ricircolare per 5 minuti;
- far circolare il campione alle seguenti condizioni operative: 10-12 psi in entrata; rapporto ritenuto/filtrato (ultraconcentrato/scarto) $1:5 \div 7$;
- 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 e/o cartuccia. Svotare il sistema completamente e raccogliere il campione;
- lavare la membrana e/o cartuccia con una soluzione di estratto di carne al 3% pH $9,5 \pm 0,2$ (2.2b), 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 o mediante precipitazione con Polietilenglicol 6000.

A fine campionamento:

- lavare la membrana con 1-2 L di acqua distillata;
- far circolare in continuo per almeno 15 minuti una soluzione di NaOH allo 0,1 M (2.3);
- lavare la membrana con 2-3 L di acqua distillata.

A questo punto la membrana può essere utilizzata per un nuovo campione o conservata per successive analisi, facendo circolare in continuo una soluzione di formaldeide allo 0,1% (2.5) 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.

7.2 Flocculazione organica

Questa tecnica si basa sulle capacità delle proteine di precipitare a pH acidi e comunque inferiori 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 potrebbe inattivare i virus presenti (esempio Rotavirus). Esistono in commercio estratti di carne purificati che migliorano il rendimento della flocculazione organica.

7.2.1 Concentrazione

La soluzione proteica è portata lentamente a pH $3,5 \pm 0,2$ e mantenuta costantemente in agitazione lenta per 30 minuti. Il flocculato è recuperato per semplice centrifugazione a 3500 g per 30 minuti a circa $+4^\circ\text{C}$. Il "pellet" è risospeso in una soluzione sterile di Na_2HPO_4 0,15 M pH 7,2 (2.7). Dopo dissoluzione del "pellet", il pH è riportato a $7,2 \pm 0,2$ con l'aggiunta di idrossido di sodio (2.3).

7.3 *Precipitazione con Polietilenglicol 6000 (PEG)*

Il PEG è un polimero sintetico solubile in acqua ed 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.

7.3.1 Concentrazione

Il campione, addizionato con PEG (2.8) in rapporto di 1:4 (v/v) (concentrazione finale 10%), è posto a circa $+4^\circ\text{C}$, in agitazione lenta per una notte.

Il precipitato, spesso invisibile, raccolto per centrifugazione a 10.000 g per 45 minuti a circa $+4^\circ\text{C}$, è risospeso nel minor volume possibile (2-3 mL) di fosfato disodico (2.7) sterile, pH $7,2 \pm 0,2$.

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 h di centrifugazione.

La precipitazione con PEG, che richiede l'utilizzo di una centrifuga ad alta velocità, è un processo meno drastico rispetto alla flocculazione organica.

8. **Isolamento ed identificazione di enterovirus**

I virus umani sono parassiti strettamente endocellulari. Necessitano quindi di cellule in cui moltiplicarsi. Alcuni virus, come i Poliovirus, possono moltiplicarsi su diverse linee cellulari, mentre altri virus presentano una specificità cellulare più stretta. Un terzo gruppo di enterovirus comprende virus che non sono in grado di moltiplicarsi in alcuna delle linee cellulari attualmente utilizzate. Essi sono evidenziabili con sistemi diversi. 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 tecniche immunologiche (immunofluorescenza diretta o indiretta, "test" immunoenzimatici, "test" radioimmunologici) o di biologia molecolare (ibridazione, 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 bassa sensibilità del "test" richiede un'elevata concentrazione virale, necessaria per una risposta positiva, difficilmente raggiungibile in campioni ambientali.

9. **Culture cellulari**

È buona norma, che tutti i laboratori di virologia ambientale, abbiano a disposizione più di una linea cellulare secondo il virus che si intende ricercare. Le linee cellulari sono classificabili in tre gruppi: cellule di primo espanto, 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 è estremamente complesso. Pertanto, pri-

ma di adottare tecniche di coltivazione e mantenimento di cellule per l'isolamento di virus da campioni ambientali, è consigliabile svolgere un periodo di addestramento 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 od in capsule di Petri in genere da 45 a 90 mm di diametro.

I monostrati cellulari ad intervalli regolari e variabili, secondo le diverse linee cellulari, devono essere separati nelle loro singole cellule da utilizzare per la preparazione di altri monostrati cellulari.

I campioni comunque concentrati presentano una notevole quantità di batteri che debbono essere eliminati prima dell'inoculo su cellule. Inoculare 0,5 mL di campione per fiasche da 25 cm² ed aggiungere uguale volume di terreno di mantenimento (diluizione finale 1:2). La quantità di campione che può essere inoculato su monostrati cellulari dipende strettamente dalla tossicità del campione ed in alcuni casi è consigliabile ricorrere a diluizioni superiori (1:7-1:10).

L'isolamento su monostrato cellulare può essere effettuato, dopo inoculo del campione sul monostrato cellulare e successivo adsorbimento del virus, aggiungendo terreno per colture cellulari in soluzione liquida o addizionato ad agar.

9.1 *Decontaminazione per filtrazione*

Esistono in commercio filtri già pre-assemblati ed a basso adsorbimento proteico. Il diametro del filtro può variare in base alla torbidità ed al volume del campione:

- 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 (2.2a) a pH 7,2 ±0,2 o con terreno per colture cellulari (2.12) al fine di prevenire l'adsorbimento aspecifico dei virus.
- Filtrare il campione e raccoglierlo in un contenitore sterile.
- Aggiungere antibiotici (2.11) in rapporto 1:50 ed incubare per 2 h a 36±1°C.

9.2 *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 minuti a temperatura ambiente.
- Prelevare accuratamente e sterilmente la fase acquosa.
- Aggiungere alla fase acquosa un "pool" di antibiotici (2.11), in rapporto 1:50.
- Mettere il campione per 2 h a 36±1°C.

9.3 *Inoculo su monostrati con 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 h 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, ripetere l'inoculo del campione su nuovo monostrato cellulare a diluizione maggiore.

In caso di assenza di tossicità, eliminare l'inoculo e lavare il monostrato cellulare con terreno per colture cellulari (2.12) o soluzione salina sterile completa di calcio e magnesio (2.6). Aggiungere 6-7 mL di terreno per colture cellulari (2.12) per fiasche da 25 cm². Incubare a 36±1°C ed 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).

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.

9.4 *Inoculo su monostrati mantenuti in terreni agarizzati*

Questa tecnica può essere applicata solo per la ricerca di virus che provocano placche di lisi ben visibili.

9.4.1 Metodo delle placche in presenza di colorante vitale

Preparare monostrati cellulari su capsule di Petri da 100 mm di diametro. Trattare il campione ed inoculare come sopra descritto (9.3) incubando le capsule di Petri in atmosfera di 5% di CO₂. Eliminare l'inoculo e lavare il tappeto di cellule con soluzione salina sterile completa di calcio e magnesio (2.6). Aggiungere 10 mL di terreno per colture cellulari doppio concentrato (2.12) addizionato con agar (2.9) (50%-50%). Dopo solidificazione aggiungere un secondo strato di terreno per colture cellulari doppio concentrato agarizzato contenente rosso neutro allo 0,1% (2.10).

Dopo solidificazione del secondo strato, incubare le piastre a 36±1°C in atmosfera di 5% di CO₂.

Il colorante vitale determina una colorazione rosso pallido del monostrato integro, mentre le placche di lisi sono visibili come foci rotondi non colorati. La giusta concentrazione di rosso neutro presente nel secondo strato deve essere determinata e valutata a seconda delle personali esigenze.

10. **Isolamento di virus che non provocano effetto citopatico: sistemi immunologici**

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 (Epatite A). Questi virus possono essere messi in evidenza con tecniche immunologiche di immunofluorescenza diretta o indiretta, "radio-immuno focus assay" (RIFA) (richiede la marcatura radioattiva dell'anticorpo) e tecniche immunoenzimatiche (ELISA) dove l'anticorpo specifico verso un determinato antigene è adeso alla fase solida (piastre per "test" ELISA a 96 pozzetti).

Ogni "test" deve sempre comprendere controlli negativi (cellule non infettate) e controlli positivi (cellule infettate con ceppi virali noti di laboratorio).

11. **Tecniche di biologia molecolare**

Possono essere applicate sia al campione concentrato (senza passaggio su monostrati cellulari) sia dopo passaggio su cellule.

Negli anni più recenti accanto ai tradizionali "test" si sono sviluppati metodi di analisi biologico-molecolare. Tali sistemi comprendono le sonde molecolari o "probes" sia a DNA sia a RNA ("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 no.

Le sonde molecolari sono costituite da RNA o DNA complementare ad una sequenza specifica ed unica del genoma virale. Tali sonde, come nel caso degli anticorpi, sono marcate con enzimi o con isotopi radioattivi. 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: 10³ particelle virali infettive).

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 è stata copiata da appositi enzimi fino ad un massimo di 10^6 copie. L'amplificato può essere successivamente risolto ed 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). Il limite di sensibilità del test è compreso tra 3-30 particelle virali infettive, sebbene, in teoria, anche una singola particella virale può essere rivelata con il "test" di reazione a catena della polimerasi. Sebbene tale "test" è oramai largamente accettato esistono, anche in questo caso, diversi problemi legati soprattutto alla presenza di inibitori aspecifici e non delle reazioni enzimatiche. Diverse procedure sono state adottate al fine di eliminare tali inibitori da campioni ambientali; è bene comunque considerare che ogni tecnica deve essere sempre attentamente valutata in laboratorio ed adattata alle personali esigenze.

BIBLIOGRAFIA

DIVIZIA M. (1996): "Il destino dei virus enterici nei fanghi di risulta degli impianti di depurazione: aspetti metodologici ed epidemiologici", *Rapporti ISTISAN 95/38*.

DIVIZIA M., DONIA D., GABRIELI R., RUSCIO V. & PANÀ A. (1997): "Valutazioni relative ad un nuovo sistema di ultrafiltrazione per la concentrazione di enterovirus e batteriofagi", *Igiene e Sanità Pubblica*, vol. LIII n. 5, 315-323.

DIVIZIA M., GABRIELI R., DONIA D., PANÀ A., OTTAVIANI M., BONADONNA L., MANCINI L., GASBARRO G., LULLI G. & ZANOBINI A. (1994): "Environmental impact od sewage sludge: possibility and limits for agricultural use", *Nuovi Annali di Igiene e Microbiologia*, **6**, 941-944.

DIVIZIA M., PALOMBI L., BUONOMO E., DONIA D., RUSCIO V., EQUESTRE M., LENO L., PANÀ A. & DEGENER A.M. (1999): "Genomic characterization of human and environmental poliovirus isolated in Albania, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, (8).

DIVIZIA M., RUSCIO V., DEGENER A.M. & PANÀ A. (1998): "Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridization", *Microbiologica*, **21**, 161-167.

GABRIELI R., DIVIZIA M., DONIA D., RUSCIO V., BONADONNA L., DIOTALLEVI C., VILLA L., MANZONE G. & PANÀ A. (1997): "Evaluation of the wastewater treatment plant of Rome airport, *Wat. Sci. Technol.*, **35** (11), 193-196.

KADER O.A., DIVIZIA M., GHAZZAWI E. EI, GAMIL F., RENGANATHAN E. & PANÀ A. (1994): "Poliovirus detection in environmental samples by cell cultures and hybridization test", *Nuovi Annali di Igiene e Microbiologia*, **6**, 935-938.

7130. Oocisti di *Cryptosporidium* e cisti di *Giardia*

1. Introduzione

1.1 Generalità

Il protozoo coccide *Cryptosporidium parvum* ed il protozoo flagellato *Giardia lamblia* sono agenti eziologici di forme acute di gastroenterite nell'uomo. Entrambe le infezioni sono trasmesse per via fecale-orale attraverso l'ingestione di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia*. Infezioni da *Cryptosporidium* e da *Giardia* sono ampiamente segnalate con una prevalenza nei paesi industrializzati dell'1-3% per il primo e del 2-5% per il secondo e, nei paesi in via di sviluppo, del 5-10% per *Cryptosporidium* e del 20-30% per *Giardia*. I dati più recenti hanno dimostrato che le oocisti e le cisti possono essere ritrovate in acque superficiali e profonde, in acque potabili marine e reflue. L'acqua è stata pertanto riconosciuta tra i principali veicoli di infezione. La scarsa specificità d'ospite favorisce la diffusione dei parassiti nell'ambiente, come anche l'elevato numero di cisti ed oocisti emesse dagli animali infetti e la loro straordinaria resistenza alla disinfezione ed alle condizioni ambientali. Le acque superficiali possono essere contaminate sia direttamente dall'apporto di feci emesse da animali infetti, sia attraverso acque di dilavamento di suoli adibiti al pascolo di animali infetti, acque di scarico e percolati. Nelle acque superficiali il valore di concentrazione di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia* può variare da 0 a 10²/L.

In considerazione della potenziale diffusione nell'ambiente dei due parassiti e del ruolo che essi possono assumere in relazione alla salute umana, si pone la necessità di definire metodi idonei alla loro ricerca nelle acque anche in funzione della loro capacità di resistenza ai trattamenti di disinfezione.

1.2 Obiettivo

I metodi consentono di valutare la concentrazione di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia* in un volume noto di acqua.

2. Metodo 1

2.1 Principio del metodo

Volumi noti del campione da analizzare sono filtrati attraverso un filtro a capsula; si procede quindi all'eluizione delle cisti ed oocisti dal filtro e alla concentrazione e purificazione dell'eluato tramite centrifugazione e flottazione. Infine, mediante immunofluorescenza diretta, si procede alla determinazione e al conteggio al microscopio.

2.2 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento. Non consente la determinazione dei parassiti a livello di specie né permette di valutarne l'infettività e la vitalità.

2.3 Possibili interferenze

Valori elevati di torbidità possono diminuire l'efficienza di recupero del metodo (20-35% per le oocisti di *Cryptosporidium* e 45-95% per le cisti di *Giardia*, prima della flottazione). Campioni particolarmente torbidi e con presenza di solidi sospesi possono intasare i pori del filtro e rendere più difficile la fase di filtrazione. Inoltre, durante la fase di identificazione al microscopio particelle di detriti eventualmente non eliminate durante i lavaggi possono nascondere la presenza di cisti ed oocisti.

3. Reattivi

3.1 Soluzione tamponata di Formaldeide al 10%

Composizione:

Na ₂ HPO ₄	0,76	g
NaH ₂ PO ₄	0,02	g
Acqua distillata	800	mL

Sciogliere i composti adottando le dovute precauzioni ed operando sotto cappa chimica aggiungendo 100 mL di Formaldeide e portando ad 1L con acqua distillata.

3.2 Soluzione di PBS (Phosphatase Buffer Saline) 10x

Composizione:

NaCl	80	g
KH ₂ PO ₄	2	g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	29	g
KCl	2	g
Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Aggiustare il pH a 7,2±0,2 con NaOH 0,1 M o HCl 0,1 M. Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C.

La soluzione è anche disponibile in commercio pronta per l'uso.

3.3 Soluzione di Percoll-Saccarosio

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. Nel corso della procedura mantenere i reattivi a circa +4°C.

3.4 Soluzione di Saccarosio 2,5 M

Composizione:

Saccarosio	855,8	g
Acqua distillata	400	mL

Preparare la soluzione sciogliendo il saccarosio in acqua distillata preriscaldata. Attendere che la soluzione si raffreddi, quindi portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

3.5 *Tampone per eluizione*

Composizione:

Laureth-12	1	g
Acqua distillata	100	mL

Preparare la soluzione sciogliendo il componente in acqua distillata in un beaker di vetro pi-
rex. Scaldare su una piastra o in un forno a microonde per consentire al Laureth-12 di scio-
gliersi. La soluzione viene quindi trasferita in un matraccio da 1 L, il beaker sciacquato nu-
merose volte con acqua distillata e i liquidi di risciacquo raccolti nel matraccio stesso. Ag-
giungere quindi i seguenti reattivi:

Tris 1 M, pH 7,4	10	mL
EDTA, 2Na 0,5 M, pH 8	2	mL
Antischiuma A	150	µL

Portare ad 1 L con acqua distillata.

3.6 *Tris 1 M, pH 7,4*

Composizione:

Tris	121,1	g
Acqua distillata	700	mL

Preparare la soluzione sciogliendo il componente in acqua distillata. Portare a pH 7,4±0,2
con HCl o NaOH 1 M. Portare a 1 L con acqua distillata. Sterilizzare con un filtro a mem-
brana da 0,22 µm; conservare in un contenitore di plastica a temperatura ambiente.

3.7 *EDTA, 2Na·2H₂O, 0,5 M, pH 8,0*

Composizione:

acido Etilendiaminotetracetico disodico, diidrato (EDTA, 2Na·2H ₂ O)		186,1 g
Acqua distillata		

Sciogliere l'EDTA nell'acqua e portare a pH 8±0,2 con HCl o NaOH 0,1 M. Portare a 1 L con
acqua distillata.

3.8 *Soluzione di lavaggio A*

Composizione:

Sodio Dodecil Solfato (SDS)	1	g
Acqua distillata	300	mL

Preparare la soluzione sciogliendo l'SDS in acqua distillata.
Aggiungere poi i seguenti componenti:

PBS 10x	100	mL
Tween-80	1	mL
Antischiuma A	500	µL

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

3.9 Soluzione di lavaggio B

Composizione:		
Tween 20	0,5	mL
PBS 10 x	100	mL

Preparare la soluzione portando a volume finale di 1 L con acqua distillata.

3.10 "Kit" per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta

I kit presenti in commercio sono composti da:

- anticorpi monoclonali diretti contro le oocisti di *Cryptosporidium* e le cisti di *Giardia* coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina (FITC);
- controllo positivo;
- controllo negativo;
- tampone di lavaggio;
- soluzione di montaggio ("Mounting Medium").

4. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi è necessario disporre di:

- agitatore con braccetti;
- 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;
- contaltri;
- contenitori da centrifuga da 250 mL con fondo conico o tipo bottiglia;
- contenitori da centrifuga monouso da 50 e 15 mL con fondo conico;
- filtro a capsula in polietersulfone, (1 µm di porosità, 6 cm di diametro, 12 cm di lunghezza, 1300 cm² di superficie);
- incubatore settabile a 36±1 °C;
- membrane di policarbonato, 1,2 µm, 25 mm di diametro;
- microscopio ad epifluorescenza con filtri di eccitazione 450-490 nm, filtro barriera 515-520, obiettivi 20, 40 e 100x ed 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 mL, 10 mL e 25 mL;
- pipettatrice automatica;
- pompa peristaltica;
- regolatore di flusso;
- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette;
- vetrini a pozzetto (compresi nel "kit" per l'immunofluorescenza);
- "vortex".

5. Procedura

5.1 Campionamento e filtrazione

Questo metodo consente di campionare volumi variabili d'acqua (10-700 L) in relazione alla sua torbidità, usando eventualmente più cartucce per filtrare il volume appropriato. La filtrazione deve avvenire con un flusso non superiore a 2 L/min.

5.2 *Eluizione della capsula*

Per l'eluizione di una capsula si utilizzano 240 mL di tampone per eluizione (3.5). Con un cilindro graduato aggiungere 120 mL di tampone per eluizione attraverso l'estremità di entrata della capsula. La capsula viene quindi posta nello "shaker" in modo che la valvola di sfogo sia posta sulla sua estremità di ingresso sia posizionata a ore 12. Si procede all'agitazione per 5 minuti a 600 rpm. L'eluato viene raccolto in un tubo da centrifuga. Aggiungere gli altri 120 mL di tampone per eluizione nella capsula e procedere ad una seconda agitazione per 5 minuti a 600 rpm, posizionando il lato di ingresso della capsula in modo tale che la valvola di sfogo sia ad ore 9. Aggiungere l'eluato ottenuto al precedente nel tubo da centrifuga. Centrifugare a 1100 x g per 10 minuti e decelerare lentamente senza usare il freno. Eliminare il supernatante con l'accortezza di non disturbare il "pellet". Misurare il volume del campione concentrato (1-10 mL). La procedura può essere interrotta in questa fase aggiungendo al campione un uguale volume di soluzione tamponata di formaldeide al 10% (3.1). Si può procedere direttamente all'analisi del campione per immunofluorescenza o, nel caso l'eccessiva torbidità del campione non lo consentisse, chiarificare il campione per flottazione.

5.3 *Chiarificazione per flottazione*

A 19,5 mL di soluzione di lavaggio A (3.8) si aggiungono 0,5 mL di campione concentrato, utilizzando una provetta da 50 mL. Miscelare ed iniettare, con una siringa provvista di cannula, 30 mL di soluzione di Percoll-Saccarosio (3.3) al di sotto della sospensione, con l'accortezza di non arrecare danno all'interfaccia tra le due soluzioni. Centrifugare a 1050 x g per 10 minuti a circa +4°C accelerando lentamente e senza usare il freno alla fine della centrifugazione. Prelevare il supernatante, l'interfaccia e circa 5 mL di Percoll-Saccarosio e raccoglierlo in una provetta da 50 mL. Portare a 50 mL con la soluzione di lavaggio B (3.9) mescolare con vortex e centrifugare a 1050 x g per 15 minuti. Scartare il supernatante fino ad ottenere un "pellet" di 1-5 mL.

5.4 *Determinazione mediante immunofluorescenza diretta*

Si usano anticorpi monoclonali anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* coniugati con FITC (3.10) che si legano ad antigeni presenti sulle pareti. Se l'analisi viene effettuata su vetrino a pozzetto, si trasferiscono 10-30 µL di campione in un pozzetto, 10 µL di controllo positivo in un altro pozzetto e 10 µL di controllo negativo in un altro ancora; si lascia asciugare a temperatura ambiente o più rapidamente in stufa a circa 36°C. Fissare ciascun campione secondo le modalità indicate dalla ditta produttrice del "kit". Mettere 20-50 µL del reagente contenente anticorpi fluoresceinati su ciascun pozzetto ed incubare il vetrino in camera umida, al buio, a temperatura ambiente per 30 minuti. Lavare delicatamente il vetrino con PBS 1x o con tampone di lavaggio e far asciugare all'aria. Porre una goccia di soluzione di montaggio su ciascun pozzetto e farvi aderire un vetrino coprioggetto, facendo attenzione a non formare bolle. Se l'immunofluorescenza viene condotta su filtro, porre la membrana (porosità 1,2 µm, in polycarbonato, di diametro 25 mm), sul supporto di filtrazione, bagnarla con PBS 1x e filtrare 1 mL di campione. Aggiungere una goccia del reagente contenente anticorpi fluoresceinati. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. Filtrare, quindi lavare per tre volte la membrana aggiungendo 3 mL di PBS 1 x o di tampone di lavaggio e filtrando di volta in volta. Eliminare ogni traccia di liquido mediante filtrazione. Porre una goccia di liquido di montaggio su un vetrino, farvi aderire la membrana, e montare su questa il vetrino coprioggetto con il liquido di montaggio.

5.5 *Esame microscopico*

Osservare l'intera superficie di ogni pozzetto a 200 o 400 ingrandimenti con il microscopio

ad epifluorescenza ed 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* (3,5-6,5 μm). Segnare le coordinate del vetrino dove sono state rinvenute le cisti e le oocisti ed 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). L'osservazione a contrasto di fase consente di distinguere le cisti ed oocisti piene da quelle vuote fornendo in tal modo indicazioni sulla presunta vitalità delle cisti ed oocisti piene. L'osservazione a contrasto interferenziale permette invece di valutare la presenza di strutture interne (nuclei, corpi mediani, spazio peritrofico nella *Giardia*; sporozoitii e granuli residui nel *Cryptosporidium*), fornendo sia una ulteriore conferma alla determinazione, sia l'opportunità di distinguere tra cisti ed oocisti vuote, contenenti strutture amorfe oppure contenenti strutture caratteristiche ben conservate. Annotare il numero totale di cisti di *Giardia* e di oocisti di *Cryptosporidium* ed eventualmente quelle che si presentano piene o vuote e con o senza strutture interne.

5.6 Interpretazione dei risultati

La presenza di strutture conformi per fluorescenza, forma e dimensioni a cisti di *Giardia* e oocisti di *Cryptosporidium* permette di considerare il campione presuntivamente positivo. Alcuni organismi (alghe e lieviti) e detriti autofluorescenti alla stessa lunghezza d'onda del FITC possono essere registrati come falsi positivi ed interferire nei risultati dell'analisi. L'impiego di disinfettanti può dar luogo ad interferenze nella individuazione delle strutture interne alle cisti ed oocisti perché può causarne la parziale distruzione o trasformazione in strutture amorfe difficilmente riconoscibili.

6. Espressione dei risultati

Il numero di cisti ed oocisti contate sull'intera superficie di ciascun pozzetto si riferisce al volume di campione ivi deponso; tale numero viene quindi rapportato al volume di "pellet" chiarificato (0,5 mL) e moltiplicato per il volume dell'eluato (1-10 mL). Il risultato viene infine rapportato al numero di litri di campione filtrati.

7. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione.

Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

8. Metodo 2

8.1 Principio del metodo

Prevede la filtrazione di campioni di acqua su membrana di porosità nominale di 0,12 μm , la dissoluzione della membrana, la concentrazione dell'emulsione mediante centrifugazione, il lavaggio del "pellet" con solventi, la determinazione e la conta al microscopio delle cisti ed oocisti mediante immunofluorescenza diretta.

8.2 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento. Non consente la determinazione dei parassiti a livello di specie né permette di valutarne l'infettività e la vitalità.

8.3 Possibili interferenze

Valori elevati di torbidità possono diminuire l'efficienza di recupero del metodo (25-40% per le oocisti di *Cryptosporidium* e 50-60% per le cisti di *Giardia*, prima della flottazione). Campioni particolarmente torbidi e con presenza di solidi sospesi possono intasare i pori del filtro e rendere più difficile la fase di filtrazione. Inoltre, durante la fase di identificazione al microscopio particelle di detriti eventualmente non eliminate durante i lavaggi possono nascondere la presenza di cisti ed oocisti.

9. Reattivi

9.1 Acetone

9.2 Etanolo

9.3 Etanolo al 70%

Aggiungere a 700 mL di Etanolo 300 mL di acqua distillata e mescolare i due componenti.

9.4 Soluzione tamponata di Formaldeide al 10%

Composizione:

Na ₂ HPO ₄	0,76	g
NaH ₂ PO ₄	0,02	g
Acqua distillata	800	mL

Sciogliere i composti adottando le dovute precauzioni ed operando sotto cappa chimica aggiungendo 100 mL di Formaldeide e portando ad 1L con acqua distillata.

9.5 Soluzione di PBS (Phosphatase Buffer Saline) 10x

Composizione:

NaCl	80	g
KH ₂ PO ₄	2	g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	29	g
KCl	2	g
Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Aggiustare il pH a 7,2±0,2 con NaOH 0,1 M o HCl 0,1 M. Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C.

La soluzione è anche disponibile in commercio pronta per l'uso.

9.6 Soluzione di Percoll-Saccarosio

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. Nel corso della procedura mantenere i reattivi a circa +4°C.

9.7 Soluzione di Saccarosio 2,5 M

Composizione:

Saccarosio	855,8	g
Acqua distillata	400	mL

Preparare la soluzione sciogliendo il saccarosio in acqua distillata preriscaldata. Attendere che la soluzione si raffreddi, quindi portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

9.8 Soluzione di lavaggio A

Composizione:

Sodio Dodecil Solfato (SDS)	1	g
Acqua distillata	300	mL

Preparare la soluzione sciogliendo l'SDS in acqua distillata. Aggiungere poi i seguenti componenti:

PBS 10x	100	mL
Tween-80	1	mL
Antischiuma A	500	µL

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

9.9 Soluzione di lavaggio B

Composizione:

Tween 20	0,5	mL
PBS 10 x	100	mL

Preparare la soluzione portando a volume finale di 1 L con acqua distillata.

9.10 Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta

I kit presenti in commercio sono composti da:

- anticorpi monoclonali diretti contro le oocisti di *Cryptosporidium* e le cisti di *Giardia* coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina (FITC);
- controllo positivo;
- controllo negativo;
- tampone di lavaggio;
- soluzione di montaggio ("Mounting Medium").

10. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi è necessario disporre di:

- 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 50-500 mL;
- contalitri;
- contenitori da centrifuga in polipropilene (PP) o in etilene propilene fluorato (teflon-FEP), da 50 mL con fondo conico;

- filtro a membrana in acetato di cellulosa con porosità nominale 1,2 μm , diametro 142 mm;
- membrane in policarbonato, di porosità 1,2 μm e di diametro 25 mm;
- microscopio a epifluorescenza con filtri di eccitazione 450-490 nm, filtro barriera 515-520, obiettivi 20, 40 e 100x ed oculare con micrometro lineare. È necessario disporre del contrasto di fase o, meglio, del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- regolatore di flusso;
- supporto per filtro a membrana da 142 mm;
- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette.

11. Procedura

11.1 Campionamento e filtrazione

Il metodo consente di analizzare volumi variabili d'acqua (5-400 L) in relazione alla sua torbidità, usando eventualmente più membrane per filtrare il volume appropriato.

La pompa aspirante è connessa al supporto per il filtro a membrana mediante tubo semirigido e un prefiltra (porosità 100-300 μm) è interposto tra la pompa ed il supporto stesso. Nella filtrazione si consiglia di non superare la pressione di circa 2 bar.

Rimuovere la membrana dal supporto mediante pinzette e porla in una provetta da centrifuga da 50 mL. Durante il trasporto mantenere le provette alla temperatura di circa +4°C. Conservare alla stessa temperatura se non si procede subito alla dissoluzione. Si consiglia di trattare il campione entro 24-48 ore dal prelievo.

11.2 Dissoluzione della membrana

Riempire la provetta con acetone (9.1) fino a portarlo a 50 mL. Agitare mediante vortex per 2-3 minuti, fino alla completa dissoluzione della membrana.

Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti e attendere che il rotore si fermi senza usare il freno. Scartare il supernatante facendo attenzione a non disturbare il "pellet" (arrestandosi a 2 cm dal fondo). Riempire nuovamente la provetta con acetone e risospingere il "pellet" agitando mediante vortex o eventualmente con l'aiuto di una pipetta. Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti. Eliminare il supernatante come sopra indicato.

11.3 Lavaggi del "pellet"

Portare il "pellet" a 50 mL con etanolo (9.2) e risospenderlo mediante vortex. Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti, aspirare il supernatante sospendere nuovamente il "pellet" portandolo a 50 mL con etanolo al 70% (9.3) ed agitando. Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti, scartare il supernatante e risospingere il "pellet" con la soluzione di lavaggio A (9.8), sempre portandolo a 50 mL. Agitare mediante vortex. Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti, scartare il supernatante e risospingere il "pellet" in PBS 1x (volume finale del campione circa 1-5 mL). Misurare il volume. Il trattamento può essere sospeso in questa fase aggiungendo al campione un uguale volume di soluzione tamponata di formaldeide al 10% (9.4).

Qualora il procedimento di concentrazione porti ad un campione finale con eccessiva torbidità, per un'analisi diretta al microscopio a fluorescenza si procede alla chiarificazione del campione.

11.4 Chiarificazione per flottazione

Procedere come al Paragrafo (5.3).

11.5 *Determinazione mediante immunofluorescenza diretta*

Procedere come al Paragrafo (5.4).

11.6 *Esame microscopico*

Procedere come al Paragrafo (5.5).

11.7 *Interpretazione dei risultati*

Procedere come al Paragrafo (5.6).

12. Espressione dei risultati

Procedere come al Capitolo (6).

13. Resoconto di prova

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

BIBLIOGRAFIA

ALDOM J.E. & CHAGLA A.H. (1995): "Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method", *Appl. Environ. Microbiol.*, **20**, 186-187.

GRACZYK T.K., CRANFIELD M.R. & FAYER R. (1997): "Recovery of waterborne oocysts of *Cryptosporidium* from water samples by the membrane-filter dissolution method", *Parasitol. Res.*, **83**, 121-125.

GRACZYK T.K., FAYER R., CRANFIELD M.R. & OWENS R. (1997): "*Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from water by the membrane dissolution method retain their infectivity", *J. Parasitol.*, **83** (1), 111-114.