ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Rapporti ISTISAN

13/46



Parametri microbiologici per il controllo delle acque di piscina: metodi analitici di riferimento





ISSN 1123-3117

A cura di L. Bonadonna, R. Colagrossi e L. La Sala

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

Parametri microbiologici per il controllo delle acque di piscina: metodi analitici di riferimento

A cura di
Lucia Bonadonna (a), Rossella Colagrossi (b) e Liliana La Sala (b)

(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Direzione Generale della Prevenzione, Ministero della Salute, Roma

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN 13/46

Istituto Superiore di Sanità
Parametri microbiologici per il controllo delle acque di piscina: metodi analitici di riferimento.
A cura di Lucia Bonadonna, Rossella Colagrossi e Liliana La Sala
2013, vii, 183 p. Rapporti ISTISAN 13/46

Il volume raccoglie i metodi analitici di riferimento per la determinazione dei parametri microbiologici nelle acque di piscina ai sensi dell'Accordo Stato-Regioni del 2003. Sono state anche inserite procedure analitiche per la ricerca di altri parametri microbiologici e per il controllo delle superfici. I metodi sono stati elaborati dal Gruppo di Lavoro "Metodi microbiologici per l'analisi delle acque di piscina".
Parole chiave: Metodi; Patogeni; Piscine; Sicurezza microbiologica

Istituto Superiore di Sanità
Microbiological parameters for the control of swimming-pool: analytical reference methods.
Edited by Lucia Bonadonna, Rossella Colagrossi and Liliana La Sala
2013, vii, 183 p. Rapporti ISTISAN 13/46 (in Italian)

The volume gathers reference analytical methods for the detection of microbiological parameters in swimming pool according to the Agreement State-Regions, 2003. Analytical procedures are also been included for the control both of other microbial parameters and of the surfaces in these utilities. The methods have been produced by the "Microbiological methods for the swimming pool analysis" Working Group.
Key words: Methods; Microbiological safety; Pathogens; Swimming pool

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

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

Citare questo documento come segue:
Bonadonna L, Colagrossi R, La Sala L (Ed.). *Parametri microbiologici per il controllo delle acque di piscina: metodi analitici di riferimento.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/46).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Fabrizio Oleari*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988 (serie: *Rapporti e congressi ISTISAN*)

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

© *Istituto Superiore di Sanità 2013*
viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma



Gruppo di lavoro "Metodi microbiologici per l'analisi delle acque di piscina"

Coordinatore: Lucia Bonadonna, *Istituto Superiore di Sanità*

Silvia Bonetta	*Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", Torino*
Paola Bottoni	*Istituto Superiore di Sanità, Roma*
Rossella Briancesco	*Istituto Superiore di Sanità, Roma*
Elisabetta Carraro	*Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", Torino*
Mattea Chirico	*Istituto Superiore di Sanità, Roma*
Rossella Colagrossi	*Ministero della Salute, Roma*
Agnese Dalla Riva	*Azienda ULSS n. 4 Alto Vicentino, Thiene*
Simonetta Della Libera	*Istituto Superiore di Sanità, Roma*
Marta Fratini	*Istituto Superiore di Sanità, Roma*
Lucia Grassano	*Azienda Sanitaria Locale Roma C, Roma*
Gianni Gurnari	*World Federation of Hydrotherapy and Climatotherapy, Rimini*
Marcello Iaconelli	*Istituto Superiore di Sanità, Roma*
Annamaria Manuppella	*Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente Molise, Isernia*
Rosella Moscatelli	*Azienda Sanitaria Locale Roma C, Roma*
Giuseppina La Rosa	*Istituto Superiore di Sanità, Roma*
Liliana La Sala	*Ministero della Salute, Roma*
Pierluigi Meloni	*Istituto Superiore di Sanità, Roma*
Rosa Paradiso	*Istituto Superiore di Sanità, Roma*
Stefania Paduano	*Istituto Superiore di Sanità, Roma*
Stefania Quintiliani	*Azienda Sanitaria Locale Roma C, Roma*
Maurizio Semproni	*Istituto Superiore di Sanità, Roma*
Alberta Stenico	*Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente, Laives, Bolzano*
Giovanna Tozzi	*Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente Umbria, Perugia*
Maria Grazia Zuccaro	*Azienda Sanitaria dell'Alto Adige, Bressanone*

INDICE

Premessa vii

Introduzione 1

Sistema di autocontrollo nelle piscine 3
Indirizzi per le misure preventive contro il pericolo di natura microbiologica 3
Redazione del documento di autocontrollo 4
Pericoli microbiologici: misure preventive e azioni correttive 5
Pericoli microbiologici nell'acqua di vasca 5
Pericolo associato a Legionella 6
Pericolo microbiologico associato a condizioni microclimatiche 7
Pericolo microbiologico negli ambienti 7
Pericoli microbiologici rappresentati dagli utenti 9
Indicazioni sui comportamenti corretti 9
Analisi microbiologiche e chimiche nel sistema dell'autocontrollo 10
Bibliografia 11

Componenti e criteri di controllo degli ambiti accessori 12
Analisi dell'impianto natatorio 12
Componenti ambientali 12
Reception 13
Spogliatoi 13
Servizi igienici 14
Percorsi e accessi alla vasca 15
Vani tecnici 15
Servizi accessori 17
Magazzini 18
Metodi di controllo 18
Registrazione dei dati 19
In sintesi 20
Bibliografia di riferimento 20

Lineamenti di tecniche analitiche nella microbiologia ambientale 23
0. Generalità 23
1. Metodi di analisi 24
1.1. Metodi tradizionali 24
1.2. Metodi rapidi 25
1.3. Metodi molecolari 26
Bibliografia di riferimento 28

Linee guida per le buone pratiche di laboratorio: analisi microbiologica 29
0. Generalità e definizioni 29
1. Ambienti di lavoro 29
2. Strumentazione 31
2.1. Autoclavi 32

2.2. Bagni termostatici 33
2.3. Bilance 33
2.4. Cappe per la sicurezza biologica 34
2.5. Dispensatori 35
2.6. Frigoriferi, celle frigorifere, congelatori 35
2.7. Incubatori 35
2.8. Incubatori in atmosfera modificata 36
2.9. Micropipette 36
2.10. Microscopi 36
2.11. Misuratori di pH 37
2.12. Termometri 37
3. Materiali 37
3.1. Capsule di Petri 37
3.2. Membrane filtranti 37
3.3. Terreni di coltura 38
3.4. Vetreria 39
Bibliografia di riferimento 39

Modalità di campionamento e conservazione dei campioni 40
0. Generalità e definizioni 40
1. Campo di applicazione 41
2. Prelievo dei campioni 41
3. Trasporto e conservazione dei campioni 43
Bibliografia di riferimento 44

Determinazione di *Escherichia coli* 45
0. Generalità 45
1. Campo di applicazione 46
2. Metodi di analisi 46
2.1. Metodo ISS Pi 001A rev. 00 46
2.2. Metodo ISS Pi 001B rev. 00 49
Bibliografia di riferimento 50

Determinazione degli enterococchi 51
0. Generalità 51
1. Campo di applicazione 52
2. Metodi di analisi 52
2.1. Metodo ISS Pi 002A rev. 00 52
2.2. Metodo ISS Pi 002B rev.00 55
Bibliografia di riferimento 57

Determinazione di *Pseudomonas aeruginosa* 58
0. Generalità 58
1. Campo di applicazione 59
2. Metodi di analisi 59
2.1. Metodo ISS Pi 003A rev. 00 59
2.2. Metodo ISS Pi 003B rev. 00 65
Bibliografia di riferimento 66

Determinazione di *Staphylococcus aureus* 68
0. Generalità e definizioni 68
1. Campo di applicazione 68
2. Metodi di analisi 69
2.1. Metodo ISS Pi 004A rev.00 69
2.2. Metodo ISS Pi 004B rev.00 73
2.3. Metodo ISS Pi 004C rev.00 77
Bibliografia di riferimento 80

Conta batterica 22°C e 36°C 81
0. Generalità e definizioni 81
1. Campo di applicazione 81
2. Principio del metodo 82
3. Strumentazione e vetreria 82
4. Terreni di coltura e reagenti 82
4.1 Substrato di isolamento 82
5. Procedura 82
5.1 Volume da analizzare 82
5.2 Semina del campione e incubazione 82
5.3 Conteggio ed interpretazione dei risultati 83
6. Espressione dei risultati 83
Bibliografia di riferimento 83

Determinazione dei batteri coliformi 84
0. Generalità 84
1. Campo di applicazione 85
2. Metodi di analisi 85
2.1. Metodo ISS Pi 006A rev. 00 85
2.2. Metodo ISS Pi 006B rev. 00 88
Bibliografia di riferimento 91

Determinazione di *Salmonella* spp. 92
0. Generalità e definizioni 92
1. Campo di applicazione 93
2. Metodi di analisi 93
2.1. Metodo ISS Pi 007A rev. 00 93
2.2. Metodo ISS Pi 007B rev. 00 99
2.3. Metodo ISS Pi 007C rev. 00 103
2.4. Metodo ISS Pi 007D rev. 00 107
2.5. Metodo ISS Pi 007E rev. 00 115
Bibliografia di riferimento 119

Determinazione di cisti di *Giardia* e oocisti di *Cryptosporidium* 120
0. Generalità 120
1. Campo di applicazione 121
2. Metodi di analisi 121
2.1. Metodo ISS Pi 008A rev. 00 121
2.2. Metodo ISS Pi 008B rev. 00 130

3. Test di biologia molecolare 134
3.1. Metodo per PCR e nested-PCR 134
3.2. Metodo per RT-PCR 139
Bibliografia di riferimento 142

Determinazione di adenovirus e norovirus 143
0. Generalità 143
1. Campo di applicazione 144
2. Metodo ISS PI 09A rev. 00 145
2.1. Principio del metodo 145
2.2. Strumentazione e materiali 145
2.3. Volume da analizzare 145
2.4. Reagenti 145
2.5. Procedura 148
2.6. Interpretazione dei risultati 154
2.7. Espressione dei risultati 154
2.8. Metodi alternativi 154
Bibliografia di riferimento 154

Determinazione di batteri, funghi e dermatofiti sulle superfici 156
0. Generalità 156
1. Campo di applicazione 157
2. Metodi di analisi 157
2.1. Metodo ISS Pi 010A rev. 00 157
2.2. Metodo ISS Pi 011B rev. 00 161
Bibliografia di riferimento 164

Appendice A
Attrezzature di base per le analisi microbiologiche delle acque 165

Appendice B
MPN: tabella per il calcolo 177

Appendice C
Piscine naturali 181

PREMESSA

Nel corso dell'ultimo ventennio lo sport è stato, per l'infanzia e l'adolescenza, il terzo pilastro educativo dopo la famiglia e la scuola. Il 67% degli adolescenti pratica una disciplina sportiva e la capacità di trasmissione di principi attraverso lo sport rappresenta un valore aggiunto di indiscutibile rilievo.

Dati dell'ISTAT (relativi al 2009) indicano che rispetto a qualche anno fa le persone che praticano sport in Italia sono poco più del 31% della popolazione, il 28%, pur non praticando sport fa attività fisica, mentre i sedentari sono il 41%.

In riferimento a quest'ultimo dato, le conseguenze sulla salute, determinate da sedentarietà, scorretta alimentazione e in generale da stili di vita non sani, sono motivi di preoccupazione e di impatto sulla salute, così come anche sulla spesa sanitaria. Un'attività fisica costante e adeguata alle condizioni individuali rappresenta un potente fattore di salute in grado di svolgere azione di prevenzione per diverse malattie anche croniche.

Ripetutamente il Ministero della Salute ha avuto modo di sottolineare che, l'uso costante e sorvegliato di una adeguata attività sportiva incrementa le difese dell'organismo, limita l'involuzione muscolo-scheletrica e cardio-vascolare e stimola le capacità mentali.

È evidente che per beneficiare pienamente degli effetti salutari derivanti dalle attività sportive, è necessario che, sia quelle di tipo agonistico sia quelle ricreative, siano praticate sotto una costante sorveglianza sanitaria e in ambienti adeguati dal punto di vista igienico-ambientale.

Tuttavia, è noto che gli impianti sportivi possono rappresentare ambienti dove la struttura stessa, le condizioni microclimatiche e le attività che vi si svolgono possono, in modo significativo, condizionare lo stato di salute, la sicurezza e il benessere degli utenti.

In particolare, l'uso di impianti sportivi come le piscine può rappresentare, in certi casi, una condizione di rischio sanitario determinante se si considera che la salubrità dell'ambiente è influenzata non solo dalla presenza di un elevato numero di impianti tecnologici, ma anche dalle caratteristiche di qualità delle acque, delle superfici e dal numero e dalle condizioni di salute dei fruitori dell'impianto.

In questo contesto, l'Accordo tra il Ministero della Salute, le Regioni e le Province Autonome di Trento e di Bolzano, pubblicato nel marzo del 2003 ed elaborato anche con il contribuito dell'Istituto Superiore di Sanità, della Federazione Italiana Nuoto, oltre che di rappresentanti delle Regioni, costituisce un importante traguardo nella definizione dei requisiti minimi igienico-sanitari, tecnici e gestionali degli impianti natatori.

È in questo ambito che si inserisce questo volume in cui sono definite e descritte le procedure analitiche da eseguire durante i controlli dei parametri microbiologici dell'Accordo Stato-Regioni, oltre che per alcuni altri parametri di particolare rilevanza sanitaria. Il volume, elaborato dal "Gruppo di Lavoro sui Metodi Microbiologici per le Piscine", costituito da esperti del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria (Reparto di Microbiologia e virologia ambientale e wellness) e da esperti provenienti da strutture del Servizio Sanitario Nazionale, può costituire un documento utile, non solo per tutte le attività di prevenzione e di verifica che l'autorità sanitaria deve eseguire, ma anche per quelle attività che, come stabilisce l'Accordo del 2003, sono a carico dei gestori degli impianti.

Loredana Musmeci

Direttore Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

INTRODUZIONE

Dall'Accordo tra il Ministero della Salute, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano, pubblicato nel marzo del 2003, la piscina è definita come un complesso attrezzato per la balneazione, con una struttura complessa per tipologie impiantistiche che può comprendere uno o più bacini artificiali pieni di acqua in cui possono venire esercitate attività ricreative, formative e sportive.

Piscine coperte e piscine scoperte possono avere non solo diverse caratteristiche strutturali e tecnologiche, ma anche diverse condizioni igieniche di qualità dell'acqua, degli spazi e delle superfici.

Se nelle piscine scoperte, le condizioni ambientali esterne possono influenzare fortemente la qualità dell'acqua e delle superfici, con aumento dei fattori di rischio per gli utenti, nelle piscine coperte, la situazione diventa più complessa. In questo tipo di impianti, oltre alla qualità delle acque utilizzate, la salubrità ambientale della struttura è funzione non solo dell'efficacia del piano di autocontrollo, e quindi dell'efficienza degli impianti tecnologici, delle procedure di manutenzione e pulizia, ecc. ma anche dello stato di igiene e di salute degli utenti e dipende dal rispetto di precise regole comportamentali da parte degli bagnanti, dei frequentatori e degli operatori dell'impianto. Una particolare rilevanza sanitaria, associata anche alle condizioni di benessere dei frequentatori, è in queste strutture da attribuire primariamente alla qualità dell'acqua (approvvigionamento, immissione, in vasca), ai sistemi di trattamento dell'acqua e dell'aria e alle condizioni termoigrometriche, illuminotecniche e acustiche dell'intero complesso.

Tuttavia, gli impianti natatori, per le loro caratteristiche di ambienti circoscritti e, in alcuni casi, affollati, potrebbero rappresentare siti dove il rischio più rilevante è quello di carattere igienico-sanitario. L'acqua in vasca, come anche le superfici degli spazi perimetrali, i percorsi a piedi nudi, gli spogliatoi, e gli stessi impianti idrici dei servizi, possono infatti rappresentare una via di trasmissione di infezioni e malattie sostenute da microrganismi che, in condizioni ambientali favorevoli, possono sopravvivere e moltiplicarsi. Gli stessi utenti sono spesso i responsabili del deterioramento della qualità igienica delle acque, come, d'altra parte, una cattiva gestione e una scarsa manutenzione dell'impianto e dei sistemi tecnologici possono favorire il mantenimento di condizioni idonee allo sviluppo microbico e alla trasmissione di patologie. Anche la presenza nell'aria di vari tipi di contaminanti di origine biologica può essere correlata ad un aumento d'incidenza di malattie di tipo allergico e infettivo, soprattutto a carico dell'apparato respiratorio.

Il rischio infettivo associato all'immersione in acque di piscina viene prevalentemente correlato alla contaminazione di origine fecale legata alla diffusione di batteri, virus e parassiti da parte dei bagnanti che sono i principali veicoli di diffusione di microrganismi nell'acqua. L'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 2006 ha pubblicato le Linee Guida per la valutazione della qualità degli impianti natatori; alla loro elaborazione hanno contribuito anche esperti del settore dell'Istituto Superiore di Sanità. Nelle Linee Guida è stato affrontato con particolare attenzione il problema della qualità microbiologica di acque ad uso ricreativo mettendo in evidenza la complessità della valutazione delle loro caratteristiche igienico-sanitarie e rilevando come, in questo tipo di acque, casi ed epidemie siano spesso associati alla diffusione di virus enterici, la cui presenza non è segnalata sulla base dei controlli di qualità effettuati di routine sulle acque. Parte degli episodi segnalati e documentati di infezioni acquisite in piscina sembrano tuttavia, più frequentemente e facilmente, attribuibili a forme batteriche, alcune delle quali, non solo sono in grado di adeguarsi alle condizioni ambientali avverse, ma anche di

trovare nicchie di moltiplicazione (es. su superfici umide). Infatti, oltre che, in alcuni casi nelle acque in vasca, ma soprattutto sui rivestimenti murari e del piano calpestio, microrganismi in concentrazioni elevate possono essere rilevati in corrispondenza dei filtri del sistema di trattamento dell'acqua o delle vasche di compenso degli impianti.

Nelle piscine sono comunque anche facilmente riscontrabili virus di origine non enterica, miceti e protozoi di origine intestinale o ubiquitari delle acque. In questo ambito, è noto anche che nella rete idrica, più che nell'acqua in vasca, possono essere presenti *Legionella*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, amebe, ecc. che, sostanzialmente ubiquitari, possono proliferare nei biofilm all'interno delle tubature e ai punti d'uso.

Piani di vigilanza sulla qualità degli impianti natatori rispondono ad un bisogno di tutela della salute e della sicurezza espresso da un bacino di utenza sempre più ampio (famiglie, associazioni agonistiche e gruppi sportivi, frequentatori di centri fitness, appassionati di discipline natatorie, ecc.). Per un'efficace azione di prevenzione è fondamentale lo svolgimento di attività di controllo dei requisiti igienico-sanitari stabiliti dall'Accordo Stato-Regioni.

In questo volume sono stati quindi raccolti, e descritti nel dettaglio, i metodi analitici per la determinazione dei parametri microbiologici da ricercare, secondo l'Accordo, nell'acqua di immissione e nell'acqua in vasca. I metodi presentati, che costituiscono quindi le metodiche ufficiali per l'analisi delle acque negli impianti natatori, sono da considerare procedure analitiche valide anche per l'analisi di acque di centri benessere (vasche idromassaggio, *hot tub*, ecc.), nonché di piscine naturali.

Sono anche riportati metodi analitici per la ricerca di alcuni organismi, come anche di virus, non direttamente inseriti tra i parametri stabiliti dall'Accordo. Tuttavia, queste procedure potrebbero essere di utilità in particolari circostanze, per approfondire l'informazione eventualmente legata a casi o epidemie correlabili alla frequentazione di questi impianti. Sebbene *Legionella* possa rappresentare un potenziale rischio per la salute degli utenti in questi ambienti, in docce e servizi, ecc. ma soprattutto se la piscina è inserita in un centro benessere o in una struttura termale con vasche idromassaggio, bagno turco, ecc., si è ritenuto opportuno rimandare alle specifiche linee guida nazionali per le procedure di valutazione del rischio e le metodiche analitiche.

Tuttavia, in aggiunta ai metodi per l'analisi microbiologica delle acque, sono state inserite anche procedure di campionamento e di analisi per il controllo microbiologico delle superfici. Infatti, queste possono costituire siti di moltiplicazione microbica come anche di diffusione di microrganismi nell'ambiente, rappresentando fonti di potenziale rischio per la salute degli utenti in questi impianti. Inoltre, un capitolo del volume è dedicato al sistema di autocontrollo in relazione alle misure preventive contro il pericolo di natura microbiologica.

Il volume, elaborato dal "Gruppo di Lavoro sui Metodi Microbiologici per le Piscine", vuole quindi costituire un riferimento per tutti i laboratori pubblici e privati che devono eseguire attività di controllo e vigilanza su questi tipi di impianti.

Al momento l'Accordo Stato-Regioni è in corso di revisione. Tuttavia, per quanto riguarda i parametri microbiologici, l'attuale revisione ha mantenuto i parametri e i valori soglia già definiti come requisiti minimi per i controlli da effettuare in questi impianti.

Per eventuali indagini microbiologiche più approfondite potrebbe essere necessario fare riferimento a gruppi di organismi diversi da quelli previsti per i controlli di routine; di alcuni di essi viene pertanto fornito il metodo analitico.

SISTEMA DI AUTOCONTROLLO NELLE PISCINE

Indirizzi per le misure preventive contro il pericolo di natura microbiologica

L'Accordo tra il Ministero della Salute, le Regioni e le Province Autonome di Trento e di Bolzano relativo agli aspetti igienico-sanitari per la costruzione, la manutenzione e la vigilanza delle piscine a uso natatorio del 16 gennaio 2003 in relazione ai controlli interni da eseguire in piscina utilizza il principio, molto diffuso nelle attività di prevenzione, dell'autocontrollo, in forza del quale il gestore, individuato nel titolare ovvero nel responsabile specificatamente delegato, si obbliga a garantire un sistema di conduzione tale da salvaguardare la salute degli utenti.

L'autocontrollo richiede che tutte le fasi che potrebbero rivelarsi critiche per la sicurezza della salute degli utenti siano monitorate mediante l'individuazione, l'applicazione, il mantenimento e l'aggiornamento di adeguate procedure di sicurezza igienica.

Il sistema costituisce un approccio metodico e sistematico al controllo dei pericoli specifici: microbiologici, chimici e/o fisici che potrebbero manifestarsi in piscina, determinandone condizioni di ridotta sicurezza per gli utenti e per gli operatori.

L'autocontrollo si basa sull'individuazione preventiva dei potenziali pericoli presenti nel complesso della piscina, allo scopo di prevenirli, ridurli o eliminarli, secondo i casi e le possibilità, attraverso l'adozione e la gestione di misure e procedure preventive o correttive.

Rientrano nell'esame per l'analisi dei rischi e sono quindi oggetto di valutazione preventiva per la stesura del documento di autocontrollo di ogni singola piscina, i seguenti ambiti:

- infrastrutture edili (tutti i locali, spazi di attività, locali tecnici, vasche, ecc.);
- impianti di produzione calore, riscaldamento, ventilazione, condizionamento, distribuzione aria calda;
- impianto idrotermosanitario;
- impianti di distribuzione energia elettrica e messa a terra;
- impianto di trattamento dell'acqua di piscina;
- arredi e attrezzature.

Tuttavia la gestione, intesa come pianificazione delle azioni all'interno di una piscina, va messa al primo posto poiché da essa dipendono scelte e decisioni relative a tutti gli elementi dell'impianto.

Il gestore della piscina è responsabile dell'applicabilità del piano di autocontrollo ed è sua facoltà nominare un suo delegato all'interno dell'impianto.

Il piano di autocontrollo deve tener conto che:

- i controlli interni sono verifiche, a carico del gestore, necessarie per garantire il rispetto delle condizioni igienico-sanitarie e dei requisiti di cui all'All. A dell'Accordo;
- i controlli sono assicurati tramite l'adozione sia di un sistema di vigilanza sia della predisposizione di interventi opportunamente documentati nei piani di autocontrollo;
- il responsabile della piscina deve individuare nell'ambito della propria attività ogni fase che potrebbe rivelarsi critica per la sicurezza igienico-sanitaria degli utenti e degli operatori, operando una attenta analisi delle modalità di conduzione del complesso natatorio. Per l'individuazione delle opportune procedure di sicurezza potrà avvalersi dei principi su cui è basato il sistema di analisi dei rischi e di controllo dei punti critici evidenziati al punto 6 dell'Accordo.

Il sistema di autocontrollo contenuto nei piani deve essere:
- congruo alla tipologia e alla specifica realtà della piscina;
- basato sulla dimostrabilità, mediante descrizione e documentazione dei flussi, delle varie fasi con relativa documentazione tecnica dell'operatività e delle verifiche aziendali del sistema applicato;
- garantito attraverso verifiche periodiche con strumentazione automatizzata sulla base della migliore tecnologia disponibile;
- a disposizione dell'Azienda Sanitaria, corredato dei relativi dati del monitoraggio.

Inoltre, potrà ritenersi completo quando sono definite le misure correttive da adottare a seguito del mancato rispetto delle condizioni prefissate per ciascun punto critico.

Il piano di autocontrollo per rispondere a criteri di efficienza ed efficacia deve essere applicato da tutto il personale coinvolto, attraverso processi che prevedono:
- consapevole assunzione di responsabilità nell'analisi e nelle verifiche delle varie fasi operative;
- corretta applicazione del sistema di autocontrollo;
- raggiungimento di adeguate capacità di intervento nell'affrontare e risolvere i problemi.

L'autocontrollo non deve essere considerato statico ma, attraverso opportune verifiche periodiche, deve tendere all'aggiornamento e al perfezionamento progressivo; inoltre, il ripetersi di condizioni di non conformità per uno stesso punto critico deve comportare necessariamente una revisione del processo e quindi i relativi adeguamenti.

Redazione del documento di autocontrollo

La prima fase è la creazione di un gruppo di figure di rilievo nella gestione della piscina che si deve occupare della costruzione del documento: tutte le procedure e le attività da mettere in atto devono essere conformi alla tipologia della struttura e contenere misure congrue ed efficaci. Il gruppo deve tener conto di tutte le informazioni riguardanti la specifica piscina che, sulla base della conoscenza ed esperienza, oltre che di quella delle altre figure professionali che a vario titolo lavorano nell'impianto, possano essere necessarie per la elaborazione del documento. Il gestore della piscina può dare mandato ai suoi collaboratori per l'avvio delle procedure necessarie alla redazione del documento e nominare un responsabile del piano.

Dovranno essere quindi interpellati per gli approfondimenti necessari: il manutentore, l'addetto agli impianti tecnologici, gli assistenti ai bagnanti, l'addetto alla gestione igienico-sanitaria, il personale operativo, ecc.

All'occorrenza potranno essere necessari contributi di esperti (di impiantistica, di sanificazione, di microbiologia, ecc.). È verosimile che una persona, avendo le conoscenze e le competenze adeguate, possa ricoprire più funzioni.

Tutte le informazioni che scaturiscono dal confronto fra le varie figure professionali sono importanti per redigere un documento congruo alla realtà della piscina e corredato delle necessarie misure preventive specifiche per prevenire la molteplicità di pericoli che potenzialmente sono presenti nella piscina.

In sintesi, il gestore della piscina, ovvero il titolare o persona delegata, deve definire e documentare le responsabilità relative a:
- pianificazione dell'intera gestione e delle procedure;
- attuazione delle procedure con i relativi monitoraggi;
- interventi di manutenzione;

- aggiornamento delle procedure soprattutto finalizzate al miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie del sistema di autocontrollo ai vari livelli operativi.

In questo contesto, il piano di autocontrollo deve contemplare tutte le fasi dove possono verificarsi pericoli di carattere microbiologico e contemplare per ciascuna le opportune misure preventive. Dovrà allo scopo essere redatto un diagramma di flusso che contempli il percorso del frequentatore dall'entrata a tutte le possibili destinazioni che l'impianto offre.

Per quanto riguarda i contenuti specifici e i requisiti del piano di autocontrollo si rimanda al volume *Rapporti ISTISAN* 07/11.

Pericoli microbiologici: misure preventive e azioni correttive

Gli impianti natatori, per le caratteristiche strutturali, microclimatiche e d'uso, si prestano ad essere ambienti in cui si possono instaurare potenziali condizioni di rischio.

I fattori di rischio sono legati ai comportamenti dei frequentatori, agli impianti tecnologici, al microclima e alla gestione.

Nella piscina, sotto il profilo microbiologico, i pericoli possono essere associati alla diffusione di alcune infezioni:

- oftalmiche e otorinolaringologiche,
- gastrointestinali,
- dermatologiche,
- dell'apparato respiratorio,

per la potenziale presenza di microrganismi patogeni e opportunisti patogeni:

- nell'acqua di balneazione,
- nell'acqua sanitaria (in particolare, *Legionella*),
- nell'aria,
- su tutte le superfici che possono venire a contatto con il frequentatore,
- nei frequentatori in qualità di "portatori".

Di seguito si prendono in esame alcuni comparti dell'impianto e per ciascuno si individuano le misure preventive più adeguate. Nel piano di autocontrollo ogni area/attività dovrà essere opportunamente documentata e corredata delle indicazioni relative alle misure correttive e di gestione delle non conformità.

Pericoli microbiologici nell'acqua di vasca

Nell'acqua in vasca possono essere presenti microrganismi (batteri, funghi, virus, parassiti) apportati dai bagnanti, dall'acqua di immissione, dalle superfici della struttura e secondariamente dall'aria. Nell'Allegato 1 dell'Accordo sono riportati i limiti dei parametri chimici e microbiologici a garanzia della qualità dell'acqua. L'allegato include anche l'elenco dei prodotti che è possibile utilizzare per il trattamento dell'acqua.

Le misure preventive per garantire la qualità dell'acqua di vasca riguardano:

- rifornimento idrico potabile e sufficiente;
- congrua quantità di acqua di reintegro;
- adeguato riciclo dell'acqua;
- adeguata concentrazione del disinfettante;

- efficienza degli impianti per il trattamento dell'acqua: prefiltri, filtri, centraline dosaggio prodotti, tubazioni, vasca di compenso;
- purezza dei prodotti usati per la disinfezione;
- buona igiene personale dei bagnanti.

Il monitoraggio della qualità dell'acqua dovrebbe consistere in:

- controlli dei requisiti chimico-fisici e microbiologici dell'acqua in vasca e, se del caso, dell'acqua di immissione;
- monitoraggio giornaliero dei parametri, cloro attivo libero, cloro attivo combinato, pH, temperatura, quantità acqua di reintegro, quantità prodotti disinfettanti, numero bagnanti;
- controlli della funzionalità degli impianti tecnologici.

Il piano di autocontrollo dovrà contemplare le misure correttive in caso di raggiungimento e/o di superamento dei limiti dei parametri con conseguenti azioni per la gestione delle non conformità.

Altresì il piano dovrà contemplare le misure correttive per gli incidenti che possono verificarsi, ad esempio, rilascio accidentale di vomito o di feci. In tale circostanza l'unico modo per tutelare la salute dei bagnanti è interdire l'uso della vasca alla balneazione per un periodo congruo di tempo, intraprendendo le opportune azioni correttive che dovranno comprendere: allontanamento del materiale contaminante, aggiunta di elevate concentrazioni di disinfettante, mantenendo tempi di contatto opportuni, verifica del ripristino delle condizioni di qualità dell'acqua anche in relazione alla concentrazione di cloro residuo che deve corrispondere a quanto stabilito nell'Allegato 1 dell'Accordo.

Pericolo associato a *Legionella*

Le misure di prevenzione per il rischio associato alla presenza di *Legionella* si basano su controlli adeguati e manutenzione mirata degli impianti di riscaldamento, ventilazione e condizionamento dell'aria, oltre che degli erogatori delle docce, dei generatori di aerosol, di eventuali vasche idromassaggio e di serbatoi di accumulo la cui acqua viene messa in distribuzione.

I fattori che predispongono la proliferazione del batterio sono:

- presenza di amebe, batteri, alghe che possono rappresentare una forma di protezione o di nutrimento, rispettivamente;
- ristagno dell'acqua;
- temperatura compresa fra 20°C e 45°C anche se non sono escluse proliferazione al di sotto di 20°C e comunque non al di sopra di 65°C;
- presenza di biofilm;
- presenza di incrostazioni, materiale organico o melma;
- condensa combinata con l'accumulo di polveri.

Informazioni utili a riguardo sono rintracciabili nelle "Linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi", attualmente in revisione.

Per contrastare il rischio di proliferazione di *Legionella* nel piano di autocontrollo dovranno essere contemplate le misure preventive rivolte sia al controllo del microclima sia dell'acqua sanitaria. I monitoraggi analitici dovrebbero essere eseguiti sulla base della normativa aggiornata di settore.

Alcune azioni preventive possono consistere in:

- conoscenza della distribuzione della rete idrica interna. È opportuno avere a disposizione la planimetria delle rete idrica, dal punto di captazione o di fornitura (contatore) fino alla distribuzione finale per la rintracciabilità del percorso dell'acqua della rete idrica interna. Dovranno essere evidenziate condutture con bracci morti, eventuali cisterne o serbatoi di accumulo e le eventuali valvole di intercettazione lungo la rete interna per la miscelazione acqua calda/fredda;
- monitoraggio e adeguamento delle temperature a cui viene mantenuta l'acqua nei serbatoi e nella rete idrica di distribuzione;
- pulizia e disincrostazione dei serbatoi di accumulo dell'acqua calda sanitaria e degli erogatori delle docce e dei rubinetti;
- ricerca del batterio effettuata con prelievi di acqua all'erogatore della doccia più svantaggiata o di fine rete;
- ricerca del batterio nella condensa della sezione di umidificazione dell'impianto di climatizzazione.

In caso di ritrovamento di *Legionella* è necessario fare riferimento, oltre che alle linee guida del 2000, anche alle "Linee guida recanti indicazioni sulla legionellosi per i gestori di strutture turistico-ricettive e termali ".

Pericolo microbiologico associato a condizioni microclimatiche

La condizione di benessere di coloro che transitano o lavorano in ambienti confinati è legata essenzialmente a quei fattori fisici (temperatura, umidità, ventilazione e ricambio dell'aria) che in varie combinazioni determinano l'entità dell'impegno dei meccanismi che assicurano la costanza della temperatura interna.

Negli impianti natatori la contaminazione microbica, così come quella fungina, associate alle condizioni microclimatiche possono essere importanti. È dovuta alla distribuzione di microrganismi che, continuamente dalla cute e dall'apparato respiratorio, viene rilasciata nell'ambiente circostante.

È importante assicurare il rispetto dei valori limite dei parametri previsti al punto 1.6 dell'Accordo adottando di volta in volta, in relazione alla tipologia impiantistica, le opportune misure preventive.

Le misure dei parametri microclimatici, dalla temperatura all'umidità relativa, velocità dell'aria e livello illuminante, devono essere eseguiti con apposita strumentazione e direttamente in loco. A posteriori potrà seguire la fase dell'elaborazione del dato.

Per la manutenzione degli impianti di climatizzazione è possibile ottenere utili informazioni per la stesura del piano di autocontrollo in "Provvedimenti della Conferenza Stato Regioni del 5 ottobre 2006 n. 2636" (Provvedimento n. 256).

Pericolo microbiologico negli ambienti

La piscina, con le sue superfici sempre umido-bagnate, gli ambienti caldo-umidi, rappresenta un ottimo substrato per la sopravvivenza dei microrganismi. Condizioni di ristagno d'acqua e umidità favoriscono il mantenimento e la moltiplicazione di alcuni microrganismi e anche la loro diffusione.

La misura preventiva per eccellenza è la sanitizzazione di tutte le superfici, in particolare dove è d'uso camminare a piedi scalzi, onde evitare l'insorgere e la diffusione di micosi, verruche e altre infezioni cutanee.

La varietà degli ambienti esistenti in una piscina, l'eterogeneità della struttura delle superfici e la consistenza dello sporco da trattare, richiedono un programma di sanificazione generale e puntuale che tenga presente le caratteristiche della struttura, della sua destinazione d'uso, delle modalità di frequentazione, ecc.

Nel piano di autocontrollo dovranno essere riportate le procedure delle pulizie illustrate per fasi, la periodicità con cui vengono effettuate, i prodotti utilizzati, il nominativo del responsabile.

Le procedure di sanificazione dovrebbero comprendere prima la fase della detersione con rimozione dello sporco che può essere di tipo organico (sostanze grasse, residui umani, residui di tipo vegetale, biofilm, muffe, ecc.) e di tipo inorganico (soprattutto depositi di sali, calcare, polveri, ecc.).

Successivamente, la disinfezione richiede prodotti specifici ad azione battericida o almeno batteriostatica e comunque sarà tanto più efficace quanto più accurata sarà stata la precedente detersione.

La disinfezione è condizionata da alcuni fattori quali:

- le caratteristiche dei microrganismi;
- la concentrazione di impiego;
- il tempo di contatto;
- particolari condizioni nelle quali il disinfettante si trova ad agire (es. la presenza di saponi neutralizza l'azione di molti prodotti disinfettanti).

I prodotti destinati alla detersione e alla disincrostazione devono essere finalizzati all'uso professionale e riportare in etichetta la composizione chimica. I prodotti per la disinfezione dovrebbero essere registrati come Presidio Medico Chirurgico (PMC) ed essere specifici per l'uso in piscina, l'etichettatura conforme alla normativa europea/CE con la dicitura della scadenza e allegata scheda tecnica di sicurezza.

La manipolazione dei prodotti e l'utilizzo da parte del personale preposto dovrà avvenire con opportune cautele per non incorrere in incidenti e danni per la salute.

Gli ambienti di un impianto natatorio, a seconda del tipo, delle condizioni di utilizzo e dell'affluenza dei bagnanti richiedono una diversificazione della frequenza e dei sistemi di sanificazione. Bisogna ricordare anche che, ad esempio, il tipo di superfice (liscia, rugosa) può molto influenzare l'attività di pulizia.

Nel piano di autocontrollo dovranno essere registrate le attività di pulizia con cadenza periodica e quelle a carattere straordinario riferite ai locali, agli impianti (es. vasca di balneazione, vasca di compenso), alle attrezzature, agli arredi, ecc., nello specifico:

- nella sezione per le attività natatorie e di balneazione e nei servizi igienici, in particolare nelle zone con percorsi a piedi nudi, la pulizia deve essere quotidianamente completata da una accurata detersione e disinfezione che deve estendersi anche alle superfici verticali;
- ogni piscina deve essere inoltre dotata di attrezzature idonee alla pulizia del fondo e delle pareti delle vasche, a vasche piene, nonché all'asportazione di materiali galleggianti;
- in occasione dello svuotamento periodico della vasca si dovrà procedere ad una radicale pulizia e disinfezione del fondo e delle pareti della vasca con revisione dei sistemi di circolazione. Dovrebbe inoltre essere praticata una pulizia, con trattamenti appositi, delle superfici per l'asportazione del biofilm, sulle pareti delle vasche. Infatti, il biofilm, che favorisce la diffusione di microrganismi, anche patogeni, rappresenta un sito di accumulo e rilascio continuo di microrganismi. Infatti, sebbene la norma UNI 10637 preveda che l'entità del rinnovo d'acqua giornaliero, che include l'acqua di reintegro, debba essere per lo meno il 5% della somma del volume d'acqua di vasca e del volume convenzionale della vasca di compenso, lo svuotamento della vasca almeno una volta l'anno ha altre

finalità. Infatti, esso è finalizzato, oltre che al rinnovo dell'acqua, all'asportazione di incrostazioni e contaminazioni di origine organica e inorganica dalle superfici interne e dal fondo delle vasche che rappresentano una fonte continua di immissione di inquinanti nell'acqua contenuta in vasca.

Se il servizio di pulizia è appaltato, il responsabile della piscina deve assicurarsi della corretta applicazione ed efficacia delle procedure inserite nel piano di autocontrollo. In caso di mancata efficacia, dovrà provvedere all'integrazione delle opportune azioni per garantire che le superfici che possono andare a contatto con il bagnante non siano di nocumento per la salute.

Per quanto riguarda il trattamento dell'aria, una buona ventilazione e un frequente ricambio, uniti ad una buona illuminazione naturale, sono già fattori di risanamento degli ambienti a patto che tutte le aree siano pulite scrupolosamente.

Se del caso, il piano di autocontrollo dovrà prevedere anche gli interventi di disinfestazione e derattizzazione, includendo le pratiche per sorvegliare l'eventuale comparsa, e quindi successiva distruzione di insetti, sia nella fase larvale che adulta e di roditori, ecc.

Fra le misure preventive contro l'annidamento e la proliferazione degli infestanti vi è la dislocazione nei vari punti dell'ambiente piscina di un sufficiente e adeguato numero di bidoni, anche in relazione all'affluenza, per la raccolta dei rifiuti, i quali dovranno essere opportunamente svuotati. Il piano di autocontrollo dovrà quindi documentare le procedure di allontanamento dei rifiuti e lo smaltimento con relativa periodicità.

Pericoli microbiologici rappresentati dagli utenti

I rischi di infezioni derivano soprattutto dalla presenza dei frequentatori, dalla loro igiene e condizione di salute e saranno tanto maggiori quanto più saranno scorretti i comportamenti sotto il profilo igienico e comportamentale. Per tale motivo la gestione della piscina deve essere mirata a non trascurare nessun elemento, compreso quello relativo alla definizione di regole per il rispetto di alcune pratiche igieniche da parte dei frequentatori dell'impianto.

Il piano di autocontrollo dovrà quindi essere corredato delle informazioni sui corretti comportamenti che, non solo i frequentatori, ma anche il personale, dovranno adottare per garantire condizioni di sicurezza.

In tutto l'impianto dovrebbero essere collocati cartelli indicatori con informazioni chiare per gli utenti che dovrebbero segnalare:

- principi di carattere generale;
- norme comportamentali da rispettare;
- necessità di vigilare sui bambini in acqua;
- ubicazione dei servizi igienici;
- caratteristiche dell'impianto (es. profondità delle vasche, permanenza in eventuali vasche idromassaggio, ecc.).

I cartelli devono inviare messaggi all'utente, stimolandolo verso un comportamento responsabile; essi costituiscono parte integrante del processo educativo del quale il gestore della piscina deve farsi carico.

Indicazioni sui comportamenti corretti

Tutti gli utenti devono essere sollecitati, attraverso un'opportuna campagna di informazione verso un comportamento responsabile, all'insegna della tutela della salute propria e altrui. Pertanto la gestione dovrà esercitare una attenta opera di educazione verso gli utenti, per il

rispetto di norme comportamentali e di igiene personale. A queste norme dovranno essere dedicati avvisi di richiamo distribuiti opportunamente nell'impianto natatorio.

Le indicazioni con le modalità di fruizione della piscina da parte degli utenti devono essere riportate, inoltre, nel regolamento interno che dovrebbe contemplare:

- norme igieniche e di comportamento da rispettare;
- norme per la salvaguardia della sicurezza;
- modalità per l'evacuazione dalla struttura;
- modalità di gestione del primo soccorso.

Si riportano alcune indicazioni che dovrebbero essere sempre previste nel regolamento interno per la tutela dal rischio di infezioni:

- usare i passaggi di bonifica verso l'area vasca e i percorsi a piedi scalzi;
- prima di entrare in vasca, sottoporsi ad una accurata doccia con uso del sapone prestando particolare cura alla pulizia delle ascelle e delle parti inguinali;
- in vasca usare la cuffia;
- usare biancheria propria evitando l'uso promiscuo degli indumenti, comprese le scarpe;
- non entrare in acqua con ferite, abrasioni, verruche, cerotti, fasce, ecc.;
- non sputare, soffiarsi il naso, urinare in acqua;
- prendere l'abitudine, prima di entrare in vasca di andare al gabinetto.

Il regolamento interno deve essere esposto in maniera ben visibile secondo modalità individuate dal gestore della piscina e tali da assicurarne la conoscenza da parte degli utenti. Sono da preferirsi mezzi di comunicazione efficaci come i mezzi audiovisivi: video, spot, filmati didattici, ecc.

Analisi microbiologiche e chimiche nel sistema dell'autocontrollo

Un sistema di controllo adeguato al mantenimento della sicurezza e alla tutela della salute delle persone non può prescindere dalle indagini analitiche, in particolare di carattere chimico e microbiologico, che permettono di verificare l'applicazione e l'efficacia delle modalità gestionali riportate nel piano di autocontrollo.

D'altra parte le analisi *in situ*, ricerca del cloro libero-cloro combinato, pH, temperatura dell'acqua e microclima, permettono di saggiare in tempo reale la tenuta del sistema e di identificare un'immediata perdita dei requisiti di sicurezza igienica, motivo di possibile rischio per la salute.

L'importanza di tali analisi emerge in determinate circostanze in cui la delicatezza del processo, come ad esempio quello del trattamento di disinfezione dell'acqua di vasca, impongono analisi costanti, ripetute e in situ proprio per avere nell'immediato il riscontro di salubrità dell'acqua. La diffusione ormai generalizzata di questo tipo di strumentazioni è correlata anche alla consistente riduzione dei costi.

La semplicità e l'economicità di utilizzo non deve tuttavia far perdere di vista la necessità di disporre di evidenze oggettive delle qualità prestazionali dei diversi metodi. Dal punto di vista del controllo di qualità dei dati, è da sottolineare l'utilità delle procedure automatiche di autotaratura e autocontrollo dello strumento che non devono tuttavia esimere dall'impiego periodico di campioni di controllo, e la corretta operatività secondo le norme fornite con il manuale di utilizzo, che può essere in molti casi utile integrare con istruzioni operative

specifiche basate sulla buona pratica di laboratorio, quali il ricondizionamento periodico dello strumento e la calibrazione successiva ad ogni utilizzo.

Bibliografia

Bonadonna L, Donati G *Piscine ad uso natatorio: aspetti igienico-sanitari e gestionali per l'applicazione della nuova. normativa*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/11).

Italia. 16 gennaio 2003. Accordo tra il Ministero della Salute, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano sugli aspetti igienico-sanitari per la costruzione, la manutenzione e la vigilanza delle piscine ad uso natatorio. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 51, 3 marzo 2003.

Italia. Accordo tra le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano sulla "Disciplina interregionale delle piscine" in attuazione dell'Accordo Stato - Regioni e pp.aa. del 16 gennaio 2003. Conferenza dei presidenti in seduta del 16 dicembre 2004. Disponibile all'indirizzo: http://gardapool.com/files/accordo_stato_e_regioni_del_16-01-03.pdf; ultima consultazione 24/1/2014.

Italia. Documento 4 aprile 2000. Linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 103, 5 maggio 2000.

Italia. Provvedimento 13 gennaio 2005. Accordo, ai sensi dell'articolo 4 del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281, tra il Ministro della salute e le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano, avente ad oggetto Linee guida recanti indicazioni sulla legionellosi per i gestori di strutture turistico-ricettive e termali. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 28, 4 febbraio 2005.

Italia. Provvedimento 5 ottobre 2006, n. 2636. Conferenza Permanente per i rapporti tra lo Stato le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano - Accordo, ai sensi dell'articolo 4 del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281, tra il Governo, le Regioni e le Province Autonome di Trento e di Bolzano sul documento recante: «Linee guida per la definizione di protocolli tecnici di manutenzione predittiva sugli impianti di climatizzazione». *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 256, 3 novembre 2006.

UNI 10637. *Piscine – Requisiti degli impianti di circolazione, trattamento, disinfezione e qualità dell' acqua di piscina*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2006.

COMPONENTI E CRITERI DI CONTROLLO DEGLI AMBITI ACCESSORI

Analisi dell'impianto natatorio

Un impianto natatorio è un articolato sistema di strutture a servizio dell'acquaticità.

Normalmente gli impianti natatori sono di due tipi: coperti o all'aperto. Sia nell'una che nell'altra tipologia i rischi per la salute, come citato in introduzione, sono molteplici seppur differenziati per le diverse condizioni al contorno.

Per un corretto approccio al tema, molto complesso per le diverse componenti coinvolte, è bene chiarire anche i termini che normalmente vengono utilizzati in questi contesti:

- per piscina si intende l'insieme dei comparti che fanno da supporto al funzionamento della vasca;
- la vasca è invece il contenitore dell'acqua, di forma e di misura variabile, entro cui praticare l'attività natatoria.

Quando si affronta il tema delle piscine ci si riferisce sia alla o alle vasche in esse contenute, ma anche agli ambienti accessori, di cui alcuni fondamentali come quelli relativi ai servizi igienici (docce, wc, ecc.) e ai vani tecnologici (dove sono inseriti "cuore" e polmoni" oltre che una parte di "cervello" della piscina).

Il livello di attenzione – nella ideazione, nella progettazione, nella costruzione e nella gestione – per tutti questi ambienti deve essere lo stesso.

L'esperienza degli ultimi venti anni insegna infatti che se l'attenzione viene prevalentemente posta sulla vasca (per il design, per l'idronica che ne determina il funzionamento, per la qualità degli accessori) il risultato in termini di prevenzione della salute, sarà molto deludente. Se invece la progettazione, la scelta delle tipologie di componenti idrauliche, di trattamento aria e sua distribuzione, la scelta dei materiali, la tecnologia, la messa in opera e le tecniche di gestione saranno improntate a identica attenzione avremo effetti positivi sotto tutti gli aspetti compreso quello economico-gestionale, oltre a quello igienico-sanitario, indispensabile anche giuridicamente.

Componenti ambientali

Le componenti ambientali di cui ci si occupa in questo contesto, considerando come caso di riferimento la piscina coperta, sono:

- la reception;
- gli spogliatoi;
- i servizi igienici;
- i percorsi e gli accessi alla/e vasca/vasche;
- i vani tecnici;
- i servizi accessori;
- i magazzini.

Viene volutamente tralasciato il comparto della vasca che rappresenta una struttura complessa, caratterizzata da diverse e articolate specifiche.

Reception

La reception rappresenta la porta di ingresso alla struttura e svolge più funzioni:
- accoglienza;
- registrazione e controllo;
- informativa;
- comunicazione;
- biglietteria e cassa;
- commerciale.

In alcuni casi, annessi alla *reception* esistono servizi aggiuntivi (bar/ristoro; *front desk* per i club agonistici/amatoriali; agenzia di viaggi: *corner* commerciale per abbigliamento e accessori piscina.

In ogni caso rappresenta il "filtro" tra esterno e interno della struttura. Qui si incrociano gli utenti che entrano in piscina e quelli che ne escono.

Come a casa propria, dall'ordine della disposizione di arredi e accessori, dalla pulizia e dei contenuti in genere (in questo caso la funzione "accoglienza" fa la differenza) si ha una prima indicazione di quali saranno i contenuti all'interno della struttura.

Il *front desk* è il luogo dell'incontro e per questa sua vocazione al promiscuo rappresenta una criticità sanitaria soprattutto connessa all'igiene delle mani.

Il mobilio del *front desk* deve essere accuratamente (soprattutto sui piani di appoggio) pulito, sanificato giornalmente e, ovviamente, ben illuminato e arieggiato.

I marcatori di questo ambito (batteri, virus, funghi, ecc.) sono inevitabilmente trasportati all'interno dell'area successiva (lo spogliatoio) insieme agli indumenti degli avventori e alle loro calzature.

Le mani che hanno stretto per saluto quelle del personale dell'accoglienza e poi hanno strisciato sul banco d'ingresso, toccano porte, maniglie, armadietti e panche dello spogliatoio. Normale in ogni ambiente comunitario, ma non nell'ambito "piscina" in cui le condizioni microclimatiche e la quantità di umidità e acqua diffusa costituiscono potenziali terreni di coltura per tutte le forme microbiche, che facilmente "migrano" da un ambiente all'altro.

Spogliatoi

Questi ambienti detengono una funzione strategica per la salute della piscina.

Dalla qualità degli spogliatoi dipende in larga misura la tutela della salute dei fruitori della struttura e le condizioni igienico-sanitarie della vasca.

Diversamente dai luoghi comuni, questa zona, divisa per sessi, va considerata a tutti gli effetti funzione strettamente connessa a quella della vasca.

Dalla fine degli anni '90 la separazione dei percorsi, "pulito" e "sporco" rappresenta ormai prassi consolidata, ma non sempre così distinta come dovrebbe.

Gli spogliatoi costituiscono la piattaforma di sedime dello "sporco" per poi rilanciare il "pulito". Con il cambio di indumenti e di calzature, si entra "sporchi"e si esce "semipuliti".

Perché semipuliti? Perché nella stessa zona di transito si passa dall'indossare i propri abiti e le proprie scarpe all'uso di costume, accappatoio e ciabatte.

Ma questa piattaforma "filtro", ai fini della prevenzione, potrebbe consentire di ridurre il carico di batteri portato all'interno dello spogliatoio. Questo filtro viene definito cabina passante, e negli impianti ben strutturati si entra da un accesso laterale "sporco" (perché vi si accede con le calzature) e si esce dal lato opposto entrando nel circuito "pulito" (con ciabatte per bagno).

I punti a rischio infettivo negli spogliatoi sono molteplici: i pavimenti (non è raro camminare a piedi nudi), gli armadietti ove si ripongono gli effetti personali; gli appendiabiti, le panche, gli asciugacapelli e gli specchi con le loro mensole portaoggetti.

Emblematico il caso degli armadietti per riporre gli oggetti e l'abbigliamento personale. In poco spazio devono assolvere molte necessità. Pochi modelli tuttavia rispondono a criteri igienico-sanitari ideali. Devono essere aperti e chiusi senza difficoltà e, per quanto possibile, anche senza l'uso delle mani. Devono essere ben aerati impendendo la formazione di condense o residui d'acqua all'interno. Devono rimanere staccati dalla parete muraria se ad essa appoggiati. L'altezza da terra non deve essere inferiore ai 20 cm per le operazioni di detergenza. I piedini di appoggio devono essere stondati per lo stesso motivo. Gli zoccoli di appoggio a terra devono essere in polimero resistente agli acidi o alle basi dei prodotti di detergenza/sanificazione. All'interno le cerniere di vincolo dell'apertura devono essere di analogo materiale, senza spigoli e senza punti inaccessibili. I dispositivi di ancoraggio interno e di sostegno dei piani divisori devono essere integrati alle pareti. Deve essere inserito un contenitore per le scarpe, oltre agli accessori usuali. Tutto questo per incrementare la prevenzione igienico-sanitaria. Infatti, l'assenza di componenti metallici (anche le eventuali viti di fissaggio dovrebbero essere totalmente isolate da polimeri plastici di sintesi, anche in testa), di asperità o punti morti che riducono la possibilità di igienizzazione interna, e la facilità di intervento manutentivo (riducendo i tempi dello stesso) dovrebbero consentire l'adozione di semplici protocolli che possano garantire la salubrità di questi arredi. Ovviamente le scelte di intervento sugli armadietti non possono prescindere da idonee prassi di sanificazione dell'ambiente e dalla scelta di prodotti per la detergenza e per la disinfezione compatibili e sostenibili per ambiente e per efficacia nell'insieme.

Dalla disposizione di tutti gli accessori funzionali, dalla qualità dei materiali costituenti, dalla qualità dell'aria immessa e dal numero di cicli di ricambio orario della stessa, dall'illuminazione dipende la prevenzione dei rischi primari connessi alla salute umana.

Se la qualità degli spogliatoi è alta per ciascuna voce indicata, sicuramente il piano vasca, la vasca e l'acqua in essa contenuti saranno di elevata qualità e con un ridotto rischio infettivo. Se viceversa la qualità anche di solo una delle voci indicate sarà carente, verranno sicuramente compromessi i risultati attesi, anche a fronte di interventi di controllo e di gestione adeguati intorno e dentro la vasca. Di solito, infatti, lo spogliatoio rappresenta lo specchio della vasca.

Servizi igienici

I servizi igienici soddisfano le funzioni specifiche di detergenza del corpo in continuità con lo spogliatoio e consentono di assolvere le normali esigenze fisiologiche.

Sono costituiti da docce (aperte, semichiuse o chiuse), lavelli (lavandini tradizionali per la pulizia delle mani, del viso e talvolta utilizzati per dissetarsi) e wc (chiusi o semichiusi). Nei gabinetti riservati ai maschi si trovano anche orinatoi a parete, con o senza velature laterali, mentre in alcuni spogliatoi per femmine sono disponibili fasciatori per i minori.

Se la pulizia in questi ambienti è d'obbligo, la detergenza va perseguita con adeguati protocolli specifici e non attraverso le pratiche comuni. Infatti questi sono ambiti che devono essere soggetti a disinfezione costante che deve essere impostata su protocolli che siano in continuità metodologica con quelli adattati per le superfici e gli accessori del bordo vasca.

I rivestimenti orizzontali e quelli verticali in queste zone sono generalmente costituiti da piastrelle ceramiche o in cotto, le cui fughe rappresentano punti di criticità igienico-sanitaria piuttosto rilevanti.

Altri punti critici sono i dispositivi meccanici di sezionamento all'erogazione dell'acqua (rubinetti, miscelatori, gruppi erogatori, corpi docce, ecc.) dove le condizioni potenziali di

contaminazione sono estreme. Anche in questo caso si deve considerare che normalmente questi erogatori sono costituiti da dispositivi idraulici classici (in lega metallica), difficili da gestire sotto i profilo della manutenzione e della sanificazione.

Queste componenti richiedono particolare perizia nella definizione dei protocolli di gestione igienico-sanitaria.

I servizi igienici devono garantire un ricambio d'aria pari (in estrazione) a minimo 8 volumi/ora, tutti da aria esterna (con pressione positiva in tutto il comparto).

Anche in questo caso l'illuminazione (quando artificiale) deve essere possibilmente superiore a quella di legge (meglio > 100 Lux).

Percorsi e accessi alla vasca

Dalla uscita destinata al percorso verso la vasca, spesso sono presenti passaggi obbligati (corridoi, porte) che portano all'interno della struttura (alla vasca principale o alle diverse vasche). Questi percorsi "puliti" (o detti "a piedi scalzi") finiscono ad un varco in cui generalmente sono presenti vasca antimicotica e docce a flusso automatico (comandate mediante sensori di prossimità): un ulteriore presidio prima di entrare nell'acqua.

Queste specifiche funzioni sono indispensabili per la salute dell'acqua in vasca. Tuttavia mancano specifiche tecniche riguardo la loro costruzione e il loro funzionamento. Ancora molti utenti (amatoriali, ma spesso anche sportivi e dediti all'agonismo natatorio) fanno un breve passaggio sotto la doccia degli spogliatoi e comunque il passaggio nella vaschetta lavapiedi – così come generalmente è attualmente utilizzata e manutenuta – pone dubbi sull'effettiva capacità di limitare la diffusione di contaminanti nella vasca.

Il passaggio in entrambi questi varchi dovrebbe rispondere a specifici requisiti che considerino il tempo di contatto dell'acqua, tale da dilavare tutte le parti del corpo (anche quelle coperte da costume da bagno e da cuffia raccoglicapelli), e, per la vaschetta lavapiedi, un flusso continuo (e quindi relativo scarico canalizzato) con soluzione disinfettante idonea.

In genere i percorsi dagli spogliatoi alle vasche devono essere di limitato sviluppo lineare al fine di limitare sia fattori di rischio igienico, sia gestionali-economici.

D'obbligo una buona illuminazione e climatizzazione, quest'ultima che consenta in ogni condizione stagionale, di avere un graduale passaggio termometrico e di umidità dalla zona dei servizi a quella destinata alla balneazione.

Vani tecnici

Quasi tutti i frequentatori di piscine sanno che il loro benessere dipende da una tecnologia che non si vede, ma non immaginano quanto questa sia complessa e quanto spazio occupa.

I vani tecnici contengono tutte le apparecchiature e i dispositivi che servono a far funzionare la piscina sia per quanto attiene l'acqua (di vasca, dei servizi) che l'aria, oltre che gli impianti elettrici e i sistemi di controllo.

Questo comparto è suddiviso spesso in sottozone:

- centrale idrica per la filtrazione e il trattamento acqua della piscina;
- centrale termica per la produzione del calore necessario a riscaldare l'ambiente e l'acqua della piscina;
- centrale idrica per la distribuzione alle diverse funzioni interne dell'acqua proveniente dalla rete urbana o da apposito acquedotto;
- centrale antincendio; questa, tramite apposito stacco, si alimenta dalla stessa derivazione dell'acquedotto che poi alimenta tutti i servizi della piscina.

Lo stacco di questa indispensabile funzione rappresenta punto particolarmente critico in quanto direttamente connesso alla rete di distribuzione dell'acqua potabile entro la piscina. In realtà rappresenta un "ramo morto" della rete distributiva interna, con relativi rischi connessi alla presenza di microrganismi quali *Legionella* sp., *Pseudomonas* sp., ecc.

Raramente si considera questo punto strategico a fini della prevenzione igienica: l'esperienza invece dimostra la necessità di adottare un organo di disconnessione con funzionamento automatico e una regolare manutenzione con specifico protocollo di disinfezione.

Associati a tale dispositivo vanno considerati:

- il bacino di accumulo e gli apparti elettromeccanici (pompe, ecc.);
- la centrale elettrica dove sono risposti quadri e apparati di gestione elettrica, destinati a presidiare un complesso sistema di illuminazione, alimentazione FEM, alimentazione dei diversi servizi, organi di controllo e telecontrollo;
- il trattamento dell'aria e la ventilazione, tramite in genere unità di trattamento aria, canali di mandata e ripresa, canali sia per l'estrazione dell'aria viziata dall'interno che di immissione di aria fresca dall'esterno (questi dispositivi si trovano anche in buona parte in copertura, ma è normale trovarli in interrato, nei pressi delle centrali idriche);
- sistemi di controllo e telecontrollo che presidiano sia gli accessi che le varie funzioni presenti nel complesso strutturale e vigilano sul buon funzionamento di gran parte dei dispositivi e delle componenti meccaniche, idrauliche ed elettriche sia presenti nei vani tecnici che in tutti i comparti funzionali e non del complesso piscina.

I vani tecnici sono strutturalmente molto complessi: in essi vengono convogliate tutte le operazioni di gestione dei fluidi e del loro governo. Ad essi conferiscono i sottoservizi pubblici (acqua di rete acquedottistica, gas di rete, energia elettrica di rete, eventuali autoproduzioni di acqua (da pozzo) e di energia elettrica/termica (da fonti rinnovabili autonome) e gli scarichi verso il sistema fognario.

La gestione di queste funzioni è estremamente delicata e comporta per gli addetti una specializzazione specifica.

Alcuni dei problemi che insorgono nelle centrali contenute nei vani tecnici si ripercuotono inevitabilmente sulla qualità della struttura natatoria. L'ordine, la pulizia, la detergenza, l'aerazione e l'illuminazione devono essere quindi assolutamente consone alle necessità anche di ordine igienico-sanitario della piscina.

La manutenzione di questo comparto non può essere molto diversa da quella dei comparti precedentemente descritti.

Anche qui esistono molti punti critici sotto il profilo igienico-sanitario e anche qui devono essere gestiti i punti di controllo con analoga attenzione posta sul piano e all'interno della vasca natatoria (ovviamente i problemi si moltiplicano in funzione del numero di vasche presenti nella stessa struttura). I problemi nascono dalla forzata coesistenza di più materiali (metallici, non metallici e polimerici di sintesi), dalla sovrapposizioni, spesso in aderenza, di reti diverse (trasporto fluidi con conduttori elettrici); dalla diffusa presenza di acqua (in forma liquida e gassosa); dalla temporanea presenza di prodotti chimici; dalla temperatura (alta) pressoché costante e dalla diffusa connessione dei raccordi con sistemi non sempre affidabili (sono ancora presenti raccordi basati su fibre di stoppa/canapa/juta, grasso organico e gomme non conformi al D.Lvo 174/2004).

In realtà questi vani tecnici dovrebbero essere visitabili dal pubblico che frequenta la piscina. In essi dovrebbero essere riportati, in ogni subcomparto e in modo ben visibile e consultabile, gli schemi funzionali generali; gli schemi unifilari, le descrizioni tecniche, i libretti bordo macchina (contenenti caratteristiche specifiche, descrizioni generali, schede manutentive, ispezioni e controlli, disposizioni di intervento).

Deve inoltre essere disponibile una cassetta del pronto soccorso e un armadio, ben identificabile e accessibile, contenente i dispositivi di protezione individuale (DPI).

Le procedure di intervento devono essere riportate nel manuale di autocontrollo che va sempre tenuto aggiornato e in cui devono essere contenuti tutti gli allegati sia di natura tecnica che di contenuto igienico-sanitario (protocolli, elenco fornitori, schede tecniche e di sicurezza dei prodotti utilizzati, punti di controllo, tempistica e metodologia dei controlli, misure di intervento ordinario e straordinario).

Nella centrale termica (e quando necessario, nella prossimale centrale di conferimento e riduzione di pressione del gas di città) vanno asservite tutte le prescrizioni dei vigili del fuoco che devono trovare giusta pubblicità in tabelle, cartelli, indicazioni puntuali per l'emergenza unitamente ad appositi contenitori di DPI. Questi ultimi in numero uguale o maggiore al numero degli addetti agli impianti.

Considerando che il personale che frequenta regolarmente i vani tecnici (i manutentori) è lo stesso che interviene in tutti i comparti adibiti alla fruizione pubblica, devono essere adottati appositi accorgimenti per prevenire il rischio infettivo. Inconsapevolmente infatti i manutentori costituiscono un potenziale portatore sano di contaminazione microbica trasversale a tutti gli ambienti piscina.

All'ingresso, in zona vasca i manutentori dovrebbero essere tenuti ad indossare appositi calzari copriscarpe o ad applicare, attraverso opportuno dispositivo automatico, una pellicola polimerica stagna aderente alla suola delle scarpe.

Servizi accessori

Tra i comparti che costituiscono parte integrante della piscina merita una riflessione il punto di primo soccorso.

Sul piano piscina deve essere disponibile un locale dove riporre un cassetta di soccorso, il defibrillatore, un lavello di tipo sanitario/chirurgico, una barella o lettiga, quanto necessita appunto per il primo soccorso (farmaci di base, disinfettanti, lacci emostatici, tutori contenitori, ecc.). Questo ambiente deve essere considerato a tutti gli effetti un piccolo e modesto presidio sanitario, ma di pari dignità ad un ambiente ospedaliero analogo.

Deve essere esente da barriere architettoniche, adeguatamente illuminato e climatizzato.

Anche se per fortuna ci si fa ricorso raramente, non può essere trasformato in deposito attrezzi o peggio in magazzino e, come tutti gli altri ambienti, va manutenuto in termini igienico-sanitari idonei.

Il bar e il punto ristoro di molte strutture acquatiche devono essere considerati come sorvegliati speciali. Sono importanti per il comfort degli utenti e consentono di fare "cassa", ma potenzialmente costituiscono areali di contaminazione.

La possibilità di metterli a bordo vasca, sullo stesso piano dello specchio idrico o rialzati sopra di questo per motivi architettonici e/o di attrattività, deve considerare comunque la necessità di adottare appositi confinamenti per impedire che anche una sola briciola o un solo goccio di bevanda venga a contatto con l'ambiente piscina. Vetrate, barriere in polimeri trasparenti, ecc. sono quindi obbligatori al fine di creare una reale compartimentazione tra ambienti che hanno funzioni diverse e non compatibili sotto il profilo della sicurezza preventiva.

Se il bar o il punto ristoro sono accessibili anche ai bagnanti, questi dovranno seguire appositi e separati accessi alla vasca, passando dai varchi antimicotici. In ogni caso si deve evitare la promiscuità tra utenti "esterni" e bagnanti.

Le eventuali attività commerciali, come gli uffici necessari, saranno invece in continuità con la reception.

Per tutti questi comparti, tuttavia, si dovranno adottare misure congrue ad ottenere la massima prevenzione igienico-sanitaria, evitando – per esempio – che lo stesso panno per lavare il pavimento passi da un ambiente umido a uno secco.

Magazzini

Ogni piscina necessita di ampi volumi da destinare a deposito di ogni tipo di materiale: dai prodotti chimici per il trattamento dell'acqua agli specifici prodotti per la detergenza compreso gli attrezzi e le macchine (come lavasciuga per pavimenti o il robot per la pulizia interna della vasca). Sono anche necessari depositi per le attrezzature proprie della vasca (accessori per le varie attività, segnacorsie, salvagenti, tavolette, dispositivi da gara, ecc.). I ricambi di parti elettromeccaniche (pompe e sezioni di distribuzione), di parti chimiche (sonde di misura, campionatori, ecc.), come pure i filtri per il trattamento, sono normalmente alloggiati negli stessi ambienti. Gran parte di quanto descritto entra a contatto con l'acqua della piscina o con gli ambiti descritti sopra.

Diventa ovvio che anche i magazzini dovranno essere oggetto di protocolli specifici di manutenzione e igienizzazione.

I prodotti chimici per il trattamento dell'acqua dovranno essere separati da tutti gli altri prodotti. Chiaramente individuabili (per segnaletica, cartellonistica, schede tecniche e di sicurezza apposte per ogni tipologia di prodotto), dovranno essere immagazzinati in apposite vasche di contenimento per le fuoriuscite accidentali o le piccole perdite delle manovre di stoccaggio. La separazione anche fisica delle singole tipologie (mediante pareti adeguate o pannelli separatori, non in legno) consentirà di evitare danni da miscela (gas o liquidi) e consentirà periodiche operazioni di detergenza senza rischio.

Analoghe prescrizioni valgono per i prodotti da detergenza - igienizzazione e per tutti i materiali depositati sia a perdere che di impiego continuo.

In definitiva, anche questo ambiente deve soddisfare norme di prevenzione della salute che non riguardano solo gli addetti alle varie operazioni di manutenzione, ma anche gli utenti.

Metodi di controllo

L'analisi della salubrità e della misura del rischio infettivo negli ambienti citati si basa sui metodi tradizionali e non richiede particolari tecniche di campionamento.

Si basa quindi su prelievi mediante tamponi ambientali, prelievi di campioni di acqua, e misure su velocità dell'aria in immissione e in estrazione, umidità relativa ambientale e misure illuminotecniche.

Per i campionamenti delle superfici si rimanda al capitolo specifico. Di seguito, comunque, si suggeriscono i principali punti critici dove prelevare i campioni rappresentativi dell'ambiente:

- *pavimenti*: all'incrocio delle fughe tra rivestimento e rivestimento in almeno tre punti per comparto, di cui almeno uno alla zoccolatura generalmente presente in prossimità delle pareti laterali;
- *rivestimenti delle pareti perimetrali*: almeno tre per ambiente di cui uno in prossimità o dietro scaffalatura e/o armadi;
- *maniglie di porte e di altre aperture (finestre, ecc.)*: nella zona di presa interna, all'attacco del serramento al supporto (infisso); sui mancorrenti presenti nei servizi igienici per disabili;

- *arredi:* due campioni ogni due panche, di cui un campione sulla seduta, all'attacco del profilo esterno (di solito metallico) e uno sullo schienale (stessa zona di prelievo);
- *manopola di apertura degli armadietti:* all'esterno e all'interno, angolo di sotto ripiano o sotto copertura; i campioni verranno prelevati su almeno tre armadietti per ogni spogliatoio.
- *montante superiore degli appendiabiti, in zona ricurva esterna*;
- *portascarpe a comparti aperti:* all'interno di due comparti diversi con l'accortezza di spingersi verso il fondo.
- *portascarpe a comparti chiusi:* oltre che all'interno di due comparti diversi con l'accortezza di spingersi verso il fondo, anche la parte interna dello sportello;
- *servizi igienici:* erogatore (base di attacco al supporto) e sottolavandino o sottotazza (se wc), pareti posteriori ai sanitari, compreso wc (anche in caso di dispositivi sospesi);
- *bordi specchio o all'angolo di attacco delle suppellettili (asciugacapelli, portasapone, portasalvietta, ecc.)*: pareti o piani di appoggio;
- *ambienti frequentati solo dagli addetti dei lavori:* pavimento e parete verticale o su ingombro esterno dei dispositivi tecnici installati (es. su un lato di un quadro elettrico) oppure ripiano di lavoro (es. scrivania, banco da lavoro).

Per la determinazione delle cariche batteriche nell'acqua di rete dei servizi, un campione dovrebbe essere prelevato dal soffione doccia e uno da erogatore al lavandino con e senza flambatura preliminare (anche in funzione della tipologia di erogatore e della finalità del controllo da effettuare).

Il numero di prelievi da docce e lavelli dipenderà dal numero dei dispositivi presenti. Nei casi di dimensioni maggiori è sufficiente un prelievo ogni cinque lavandini e uno ogni sei docce. Se i lavandini e le docce sono in numero inferiore, è bene comunque prelevare due campioni per ogni tipologia di servizio igienico.

Un campione di acqua di doccia dovrà essere prelevato al varco di accesso bordo vasca.

Per il trattamento dell'aria non sempre sono presenti dispositivi di areazione e circolazione forzata dell'aria. Quando presenti dovranno essere prelevati campioni di aria almeno da una bocchetta o griglia di immissione (mandata) e dalla bocchetta o griglia di estrazione (ripresa): i metodi sono quelli classici per la determinazione della carica batterica sull'aria di circolazione forzata. Con apposita ventolina (strumento tarato in laboratorio) saranno rilevati velocità di flusso, temperatura e umidità relativa. Ogni misura va effettuata a circa un metro di distanza dalla griglia/bocchetta, perpendicolarmente a questa. I valori registrati saranno riportati in apposita scheda del manuale di autocontrollo. Tuttavia negli spogliatoi e nelle aree dei servizi igienici dovranno essere periodicamente prelevati anche tamponi direttamente dalle griglie o bocchette, o meglio ancora, dalle pareti interne dell'attacco dei canali (di qualunque sezione).

Quando il riscaldamento avviene tramite dispositivi radianti (radiatori, termosifoni), un tampone ambientale verrà prelevato dalla parete di appoggio dello stesso dispositivo idraulico, nella parte superiore.

Registrazione dei dati

Tutte le operazioni citate dovranno essere descritte sia in termini metodologici che cronologici sull'apposito "Manuale di autocontrollo". In esso devono essere riportati:

- i punti critici di controllo;
- la frequenza dei controlli in autocontrollo;

- i risultati analitici;
- i protocolli di intervento in manutenzione ordinaria;
- i protocolli specifici per le attività straordinarie;
- l'elenco dei prodotti da utilizzare per la detergenza, per la igienizzazione e la sanificazione dei diversi comparti;
- schede tecniche e di sicurezza dei singoli prodotti;
- l'elenco dei fornitori;
- elenco numeri di telefono per le emergenze.

Le forniture, soprattutto dei prodotti chimici per il trattamento acqua (o per la prevenzione della legionellosi, ecc.), dovranno essere immagazzinate in locali adeguati, dove le temperature non possano essere inferiori ai 12°C e mai superiori ai 25°C, sufficientemente arieggiati e privi di umidità. Per ogni lotto di prodotto, dovrà essere chiaramente indicata la data di produzione (o di scadenza), avendo cura di utilizzare prodotti sempre di recente fabbricazione al fine di avere titoli di concentrazione chimica adeguati alle reali esigenze.

In sintesi

Tutte le indicazioni e le prescrizioni riportate debbono essere considerate veri e propri supporti alla buona gestione dell'impianto natatorio. Infatti, una buona diagnosi serve a mettere a punto criteri e metodi di manutenzione per cui possono essere migliorate le condizioni generali della piscina percepibili in modo tangibile anche dal pubblico (con conseguente gradimento e fidelizzazione) e, paradossalmente, ottenere risparmi economici sulla gestione specifica della struttura.

Poiché la gestione, come la manutenzione, è affidata al personale, è consigliabile un percorso formazionale che periodicamente consenta l'aggiornamento professionale proprio per ottenere i migliori risultati.

Bibliografia di riferimento

Associazione professionale Italiana Ambiente e Sicurezza (AIAS). *Sicurezza delle piscine nelle strutture ricettive ed alberghiere. Documento tecnico operativo n. 4/2010*. Milano; 2010.

Bonadonna L, Donati G *Piscine ad uso natatorio: aspetti igienico-sanitari e gestionali per l'applicazione della nuova normativa*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/11).

CEI EN 60529. *Gradi protezione degli involucri (codice IP)*. Milano: Comitato Elettrotecnico Italiano; 1997.

DIN 19643-1. *Treatment of the water of swimming-pools and baths - Part 1: General requirements*. Deutsches Institut Fur Normung E.V.;2012.

Europa. Direttiva 1998/83/CE 3 novembre 1998, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 330/32, 5 dicembre 1998.

Europa. Direttiva 2006/7/CE 15 febbraio 2006, relativa alla gestione della qualità delle acque di balneazione e che abroga la direttiva 76/160/CEE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 64/37, 4 marzo 2006.

Europa. Direttiva 2009/125/CE 21 ottobre 2009 relativa all'istituzione di un quadro per l'elaborazione di specifiche per la progettazione ecocompatibile dei prodotti connessi all'energia (rifusione). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 285/10, 31 ottobre 2009.

Europa. Direttiva 2012/27/UE 25 ottobre 2012 sull'efficienza energetica, che modifica le direttive 2009/125/CE e 2010/30/UE e abroga le direttive 2004/8/CE e 2006/32/CE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 315/1, 14 novembre 2012.

Gurnari G. *Hotel benessere. Lo spazio benessere nelle strutture ricettive*. Milano: Il Campo; 2005.

Italia. Accordo tra le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano sulla "Disciplina interregionale delle piscine" in attuazione dell'Accordo stato - regioni e pp.aa. del 16 gennaio 2003. Conferenza dei presidenti in seduta del 16 dicembre 2004. Disponibile all'indirizzo: http://gardapool.com/files/accordo_stato_e_regioni_del_16-01-03.pdf; ultima consultazione 29/01/2014.

Italia. Conferenza permanente per i rapporti tra lo stato le regioni e le province autonome di Trento e Bolzano provvedimento 5 ottobre 2006. Accordo, ai sensi dell'articolo 4 del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281, tra il Governo, le Regioni e le Province Autonome di Trento e di Bolzano sul documento recante: Linee guida per la definizione di protocolli tecnici di manutenzione predittiva sugli impianti di climatizzazione. Repertorio atti n. 2636. *Gazzetta ufficiale – Serie Generale* n. 256, 3 novembre 2006.

Italia. Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale* n. 52, 3 marzo 2001 - Supplemento Ordinario n. 41.

Italia. Decreto Legislativo 30 dicembre 1992, n.502. Riordino della disciplina in materia sanitaria, a norma dell'articolo 1 della legge 23 ottobre 1992, n. 421. *Gazzetta ufficiale – Serie Generale* n. 305, 30 dicembre 1992.

Italia. Decreto Legislativo 9 aprile 2008, n. 81. Attuazione dell'articolo 1 della legge 3 agosto 2007, n. 123, in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro. *Gazzetta Ufficiale* n. 101, 30 aprile 2008 - Supplemento Ordinario n. 108.

Italia. Decreto Ministero della Sanità 26 marzo 1991. Norme tecniche di prima attuazione del decreto del Presidente della Repubblica 24 maggio 1988, n.236, relativo all'attuazione della direttiva CEE n.80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'art.15 della legge 16-4-1987, n.183. *Gazzetta ufficiale – Serie Generale* n. 84, 10 aprile 1991.

Leoni E. *Igiene in piscina*. Milano: Il Campo; 2007.

Norma Italiana CEI 64-8/7. *Impianti elettrici utilizzatori a tensione nominale non superiore a 1000 V in corrente alternata e a 1500 V in corrente continua. Parte 7: Ambienti ed applicazioni particolari*. Milano: Comitato Elettrotecnico Italiano; 2012.

Romano Spica V, Bonadonna L, Fantuzzi G, Liguori G, Vitali M, Gurnari G, Pedullà S. *Sicurezza dell'acqua negli edifici. Traduzione italiana*. Istituto Superiore di Sanità; 2012. (Rapporti ISTISAN 12/47).

UNI 10339. *Impianti aeraulici al fini di benessere. Generalità, classificazione e requisiti. Regole per la richiesta d'offerta, l'offerta, l'ordine e la fornitura*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 1995.

UNI 10637. *Piscine – Requisiti degli impianti di circolazione, trattamento, disinfezione e qualità dell' acqua di piscina*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2006.

UNI EN 1069-1. *Acquascivoli – Parte 1: Requisiti di sicurezza e metodi di prova*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2010.

UNI EN 13451-1. *Attrezzature per piscine – Parte 1: Requisiti generali di sicurezza e metodi di prova*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2011.

UNI EN 15288-1. *Piscine – Parte 1: Requisiti di sicurezza per la progettazione*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2010.

UNI EN 15288-2. *Piscine – Parte 2: Requisiti di sicurezza per la gestione*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2009.

UNI EN ISO 9000. *Sistemi di gestione per la qualità – Fondamenti e vocabolario*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2005.

UNI EN ISO 9001. *Sistemi di gestione per la qualità – Requisiti*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.

Von Storch K. *Quality standard for Medical Spas and Medical Wellness Providers in Europe*. Stuttgart: Schweizerbart Science Publishers; 2012.

World Health Organization. *Guidelines for drinking – water quality, 3rd ed*. Geneve: WHO; 2008.

World Health Organization. *Guidelines for safe recreational water environments. Vol. 2: swimming pools and similar environments*. Geneve: WHO; 2006.

World Health Organization. *International health regulations (2005) – 2nd ed*. Geneve: WHO; 2008.

LINEAMENTI DI TECNICHE ANALITICHE NELLA MICROBIOLOGIA AMBIENTALE

0. Generalità

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

È noto che non tutti i metodi microbiologici sono idonei all'analisi di tutti i tipi di matrici ambientali. L'analisi di uno stesso parametro in acque con caratteristiche di qualità diverse può comportare l'uso di metodi diversi che tengano conto delle marcate differenze di natura chimica, chimico-fisica, biologica e organolettica. I risultati di un controllo microbiologico sono sempre definiti dal metodo usato. Quando, ad esempio, si esamina lo stesso campione con metodi diversi, è inevitabile che si ottengano risultati diversi. Infatti, metodi diversi possono coprire porzioni differenti della popolazione microbica. Ne è esempio il confronto tra conteggi di microscopia e conteggi su terreni di coltura anche non selettivi, oppure risultati ottenuti con terreni di coltura particolarmente ricchi o poveri in nutrienti organici, substrati liquidi o agarizzati, e comunque specifici per un dato microrganismo ma con formulazioni diverse. Inoltre, questo è particolarmente vero per l'isolamento di organismi bersaglio che non sono inequivocabilmente definiti dal metodo, ma anche per organismi bersaglio definiti in base all'ordinamento tassonomico. Anche la vitalità di un microrganismo influisce con rilevanza sul suo isolamento; microrganismi danneggiati o stressati dalle condizioni ambientali possono rispondere in modo diverso alle condizioni standard di laboratorio (selettività del substrato, temperatura). Quindi a volte non basta inoculare semplicemente un'aliquota di campione nel terreno di coltura o sulla sua superficie, per ottenere risultati precisi. Le cellule degli organismi bersaglio possono essere danneggiate e può essere necessario rivitalizzarle prima di metterle a contatto col terreno di coltura selettivo. Tale procedura, indicata come rivitalizzazione, può essere parte integrante del metodo di controllo e implica generalmente l'incubazione in un terreno di coltura meno selettivo e/o a una temperatura meno elevata.

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

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

Non esiste nessun criterio obiettivo che permetta di stabilire quale metodo dia risultati migliori, in quanto il risultato dipende anche dagli scopi dell'analisi.

In questo ambito si tende generalmente a valutare l'equivalenza tra metodi analitici microbiologici. Le procedure analitiche e le successive valutazioni statistiche, necessarie per addivenire al risultato, sono impegnative e necessitano della collaborazione di statistici esperti nel campo specifico.

1. Metodi di analisi

1.1. Metodi tradizionali

1.1.1. Tecnica dei tubi multipli o del numero più probabile

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

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

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

I volumi di acqua che possono essere esaminati con la tecnica MPN sono ridotti in considerazione delle difficoltà tecniche di preparazione e distribuzione di aliquote elevate del campione di acqua da esaminare. La tecnica dell'MPN tradizionale, è certamente superata per l'analisi di acque trattate e, anche per l'analisi di acque con particolato in sospensione, è stata pressoché soppiantata dalla tecnica MPN miniaturizzato a multipozzetto.

1.1.2. Tecnica della filtrazione su membrana (MF)

La metodica della filtrazione su membrana si adatta a tutti i tipi di acqua, tranne che a quelle particolarmente torbide. Consente di ottenere risultati in tempi più brevi rispetto a quelli richiesti per il metodo tradizionale del numero più probabile (MPN), ma generalmente più lunghi rispetto alla tecnica miniaturizzata a multipozzetto; inoltre permette di esaminare anche grandi volumi di acqua di buona qualità. Presenta diversi vantaggi consentendo di rilevare direttamente (per conta diretta) il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato, contando le colonie sviluppate su una membrana, semplificando le procedure di laboratorio e abbreviando i tempi operativi anche in funzione dei tempi di incubazione;

La procedura della filtrazione su membrana permette di contare i microrganismi che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie della membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno prodotto colonie. Poiché non è possibile determinare se una colonia individuale sia formata da una o più cellule batteriche, il numero di colonie ottenuto si riporta come "Unità Formante Colonia" (UFC), valore poi riferito, generalmente, a 100 mL del campione analizzato. Si accetta, pertanto, che una cellula batterica produca una colonia e che la conta riporti direttamente il numero di batteri presente.

L'accuratezza del risultato dipende dal numero di colonie contate. È necessario, infatti, che il numero delle colonie sia compreso in limiti leggibili. Un numero di colonie della membrana

compreso generalmente tra 20 e 80 e non superiore a 200 fornisce un risultato accettabile e statisticamente accurato.

Il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato si ottiene dalla equazione:

$$\text{UFC/100 mL} = \frac{\text{N. delle colonie contate} \times 100}{\text{mL di campione filtrati}}$$

1.1.3. Tecnica dell'agar germi

Nella forma più semplice, il metodo di conta diretta si esegue inoculando un'aliquota nota, generalmente non più di 1 mL, di campione sulla superficie di un terreno di coltura agarizzato selettivo o non selettivo (metodo della semina in superficie). Ogni singola cellula dell'organismo bersaglio si moltiplicherà formando una colonia visibile ad occhio nudo. I risultati di questo tipo di analisi sono espressi pertanto come la concentrazione (numero) di unità che formano una colonia (Unità Formanti Colonia, UFC) per unità di volume. Si accetta che ogni UFC rappresenti una o più cellule dell'organismo bersaglio nel campione originario e che, pertanto, la conta riporti direttamente il numero di batteri presenti. L'accuratezza del risultato dipende dal numero di colonie contate. È necessario, quindi, che il numero delle colonie cresciute sia compreso in limiti leggibili. Un numero di colonie compreso generalmente tra 20 e 80 e non superiore a 200 fornisce un risultato accettabile e statisticamente accurato.

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

1.2. Metodi rapidi

Requisito essenziale per un metodo rapido è quello di fornire risultati nel più breve tempo possibile. Una maggiore rapidità nella risposta rispetto ai metodi analitici più tradizionali dà l'indubbio vantaggio di ottenere in tempi più brevi il segnale dell'eventuale presenza di una contaminazione, requisito prioritario in un contesto di prevenzione e tutela della salute pubblica. Un sistema analitico rapido dovrebbe essere abbastanza sensibile da mettere in evidenza il più basso livello rilevabile di batteri nel 50% del tempo richiesto da un metodo di riferimento e con una specificità almeno del 90%.

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

Al momento attuale, numerosi sono i metodi cosiddetti rapidi disponibili in commercio.

Gran parte dei metodi con questa caratteristica, attualmente disponibili, sono stati elaborati per la determinazione degli indicatori di contaminazione fecale e per opportunisti patogeni e spesso sono basati sullo stesso principio. Nella maggior parte dei casi sono in grado di fornire il risultato dell'analisi entro 18-48 ore, e, rispetto ai metodi tradizionali, che necessitano della conferma degli isolati – con conseguente allungamento dei tempi della risposta (48÷72 ore o

oltre) – hanno generalmente maggiore specificità, precisione e sensibilità e non richiedono lo svolgimento di prove di conferma.

Si tratta di metodi che si basano sull'attività metabolica di specifici enzimi cellulari dei batteri. Enzimi come β-D-galattosidasi, β-D-glucuronidasi, β-D-glucosidasi e amino-peptidasi sono quasi esclusivi dei batteri coliformi, di *Escherichia coli*, degli enterococchi e di *Pseudomonas aeruginosa*, rispettivamente. L'uso di specifici substrati, tramite l'idrolisi enzimatica di sostanze cromofore o fluorofore, permette di selezionare i microrganismi ricercati senza necessità di svolgere ulteriori prove per la conferma dell'appartenenza al genere o alla specie.

Sebbene negli anni più recenti si siano moltiplicati i metodi enzimatici che usano la tecnica della filtrazione su membrana, quelli che hanno avuto riconoscimenti e approvazioni ufficiali da enti di normalizzazione internazionali (*International Organization for Standardiztion*, ISO; *Association of Official Analytical Chemists*, AOAC International) o che sono stati normalizzati a livello nazionale (*Association Française de Normalisation*, AFNOR; *Deutsches Institut für Normung*, DIN) sono stati i metodi ad inoculo multiplo (MPN miniaturizzato a multipozzetto).

In questo caso, rispetto alla tecnica MPN più classica, le nuove tecniche prevedono l'aumento del numero di inoculi del campione in parallelo, con conseguente aumento della precisione che diventa equiparabile o anche superiore a quella della tecnica di conta diretta. La caratteristica di queste tecniche è la miniaturizzazione a pozzetti e la facilità di esecuzione e di lettura dei risultati che sono meno soggetti ad un'interpretazione arbitraria da parte degli operatori.

Queste tecniche sono idonee non solo per l'analisi di acque trattate e disinfettate, ma anche per acque contenenti particolato in sospensione (acque marine, superficiali, reflue) e fanghi.

Per l'esecuzione delle procedure analitiche si rimanda ai metodi specifici descritti in questo volume.

1.3. Metodi molecolari

I passi avanti della biologia molecolare negli ultimi 25 anni hanno portato allo sviluppo di nuovi metodi di ricerca dei microrganismi nelle acque basati sulla individuazione di specifiche sequenze geniche. Ad esempio, è possibile dimostrare la presenza di sequenze significative del genoma o di specifici RNA ribosomiali grazie all'ibridazione con idonee sonde molecolari (sequenze nucleotidiche complementari a tratti specifici del genoma) seguite dalla reazione di polimerizzazione a catena (*Polymerase Chain Reaction*, PCR). Con lo sviluppo dell'amplificazione genica sono stati raggiunti livelli di sensibilità mai ottenuti con le altre tecniche di rilevazione tradizionali. Tali metodi sono usualmente rapidi e possono essere applicati per la ricerca sia di specifici patogeni che di gruppi di microrganismi.

I metodi molecolari potranno avere nel futuro un sempre maggiore impiego nel controllo della qualità delle acque, rappresentando una valida alternativa ai metodi di ricerca diretti basati sulla coltivazione in idonei substrati, soprattutto se si pensa a organismi non facilmente coltivabili o danneggiati.

1.3.1. PCR

La PCR è una reazione di amplificazione in vitro di un segmento specifico di DNA, ottenuta per mezzo di una DNA polimerasi a partire da una coppia di *primer* specifici. Con questo metodo piccole quantità di DNA possono essere selettivamente moltiplicate. In breve, una singola copia della sequenza specifica scelta in questo saggio può produrre più di un milione di identiche copie di DNA che possono poi essere individuate impiegando differenti metodi.

Questo metodo è stato efficientemente messo a punto per la ricerca di diversi patogeni nelle acque e sono disponibili kit commerciali come, ad esempio, quello per la ricerca di *Legionella* in campioni di acqua.

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

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

I vantaggi della PCR risiedono nella elevata sensibilità, rapidità e accuratezza del metodo. La tecnica è altamente specifica e di facile applicazione e permette di analizzare più campioni contemporaneamente; il costo è relativamente contenuto e dà la possibilità di evitare reazioni crociate eliminando i falsi positivi. Tuttavia questo metodo permette di effettuare solo una valutazione di tipo qualitativo, mentre è la Real Time che permette di quantificare i prodotti di PCR. La PCR real-time consente di seguire l'accumulo del prodotto di PCR continuamente durante la reazione di amplificazione stessa. Con questa tecnica si possono impiegare diversi reagenti fluorescenti che, legando in modo specifico o aspecifico il DNA, permettono di seguire l'accumulo del prodotto di PCR mediante la misurazione di un segnale specifico in emissione. Se si utilizzano sonde a DNA il segnale emesso in seguito all'ibridazione della sonda sulla sua sequenza omologa corrisponde in modo specifico all'amplificazione del target: in altre parole, ogni evento di polimerizzazione dell'acido nucleico target (virale o microbico) è testimoniato dal rilascio in soluzione di una determinata quantità di fluorescenza della lunghezza d'onda di emissione tipica della sonda.

1.3.2. Ibridazione con sonde

Le tecniche di ibridazione si basano sul fatto che il DNA è una molecola a doppia elica che può essere denaturata reversibilmente con alcali o calore. La reazione di riassociazione è molto specifica e dipende dalla complementarietà delle due catene polinucleotidiche. Sequenze di DNA possono quindi essere riconosciute utilizzando una sonda (probe) polinucleotidica complementare a tratti specifici del genoma che si voglia individuare (bersaglio o target). La sonda si legherà in maniera specifica al bersaglio (preventivamente denaturato) e formerà con esso un DNA duplex ibrido, che potrà essere riconosciuto se la sonda è stata marcata con un rivelatore (tracciante) della reazione (esempio, enzimi o isotopi radioattivi). Uno dei principali limiti delle sonde molecolari è quello di non poter distinguere tra particelle infettanti. Inoltre la sensibilità delle sonde è troppo bassa per la rilevazione di virus in acque scarsamente contaminate. Una tipologia particolare di ibridazione con sonde è rappresentato dalla FISH (*Fluorescence In Situ Hybridisation*). Questo metodo implica l'uso di sonde geniche legate a marker fluorescenti, solitamente in grado di appaiarsi all'RNA ribosomale 16S (16S rRNA). I microrganismi concentrati e fissati sono permeabilizzati e miscelati con la sonda. La temperatura di incubazione e l'aggiunta di composti chimici può influenzare il legame tra la

sonda e la sequenza target. Poiché il segnale proveniente da una singola molecola di DNA fluorescente all'interno di un microrganismo non ne permette l'individuazione, è necessario selezionare una sequenza target con copie multiple nella cellula. Sebbene vi siano risultati controversi per alcuni patogeni, in condizioni di stress, i microrganismi possono entrare in uno stadio vitale, non replicativo e non coltivabile (VNC). Recenti studi hanno permesso di concludere che i metodi basati sulla PCR e sulla FISH possono permettere di rilevare con maggiore attendibilità, rispetto ai metodi tradizionali, la presenza di patogeni e indicatori batterici vitali, anche nello stadio VNC.

Bibliografia di riferimento

American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd ed. Washington, DC: APHA; 2012.

Bonadonna L. Rapid analysis of microbial contamination of water. In: Tothill IE (Ed.). *Rapid and on-line instrumentation for food quality assurance*. New York: Woodhead Publishing in Food Science and Technology; 2003. p. 161-82.

Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Westfall MV (Ed.). *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. 3rd ed. London: CRC Press; 2011.

Dalla Valle JM. Notes on the Most Probable Number index as used in bacteriology. *Publ Health Rep* 1941;58:299.

Dutka, BD. *Membrane filtration applications. Techniques and problems*. New York: Marcel Dekker Inc; 1981.

Lightfoot NF, Maier EA (Ed.). *Analisi microbiologica degli alimenti e dell'acqua. Linee guida per l'assicurazione di qualità.* Pavia: La Goliardica Pavese; 2002.

Ottaviani M, Bonadonna L, Lucentini L, Pettine P. *Requisiti organizzativi e tecnici dei laboratori di verifica della conformità della qualità delle acque.* Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/18).

LINEE GUIDA PER LE BUONE PRATICHE DI LABORATORIO: ANALISI MICROBIOLOGICA

0. Generalità e definizioni

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

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

- *Materiale di riferimento (MR)*
  materiale sufficientemente omogeneo e stabile in riferimento alle proprietà specificate, che si è stabilito sia adatto all'uso preposto in una misurazione o nell'esame di proprietà nominali.
- *Materiale di Riferimento Certificati (MRC)*
  materiale di riferimento accompagnato da un certificato rilasciata da un ente autorizzato e che fornisce uno o più specifici valori di prestazione a cui sono associati incertezza e tracciabilità, impiegando procedure valide.

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

1. Ambienti di lavoro

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

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

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

- spazio sufficiente;
- disposizione concepita per l'efficienza;
- spazio sufficiente per le attrezzature;
- ufficio per il personale amministrativo;
- guardaroba per tutto il personale;

- depositi e armadi idonei per i campioni, le attrezzature, i terreni di coltura, i reagenti e i prodotti chimici e la vetreria.

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

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

In condizioni ideali, un laboratorio di microbiologia dovrebbe comporsi di una serie di aree separate; è comunque necessario che lo svolgimento del lavoro sia tale da distinguere le zone 'pulite' da quelle 'sporche'. Per l'organizzazione di un laboratorio di microbiologia è imprescindibile attenersi a quanto definito, dal D.Lvo 81/2008 e s.m.i. che così stabilisce: "il datore di lavoro adotta idonee misure di contenimento in conformità all'Allegato XLVII".

Dovrà pertanto essere garantita la sicurezza del personale. A tale scopo è opportuno tenere in considerazione quanto indicato dal DLvo. 81/2008 e s.m.i dove viene fatto riferimento anche alle misure da applicare all'interno dei laboratori di microbiologia in funzione della natura degli agenti biologici da ricercare o trattare al fine di valutare i rischi per i lavoratori.

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

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

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

Tutte le apparecchiature e le sorgenti di alimentazione della rete elettrica dovranno essere adatte alle prove da effettuare e dovrà essere verificato l'adeguamento a particolari condizioni ambientali.

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

Il monitoraggio biologico degli ambienti costituisce un punto basilare per avere la garanzia di operare in locali dove le prove non vengono influenzate da inquinamenti indipendenti dalla

natura del materiale in esame. Un corretto monitoraggio biologico ambientale potrà comprendere controlli dell'aria, delle superfici di lavoro, dei termostati, dei frigoriferi e delle cappe a flusso laminare. Le frequenze dei controlli saranno definite all'interno di ogni laboratorio in funzione dell'effettivo carico inquinante gravitante sul laboratorio stesso.

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

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

2. Strumentazione

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

Di seguito, per opportuna conoscenza, vengono riportate le definizioni:

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

Nell'ambito dei controlli da effettuarsi in laboratorio, sarà opportuno prevedere quindi:
- modalità di taratura e manutenzione;
- loro frequenza;
- personale responsabile delle verifiche.

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

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

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

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

Di seguito sono elencate e descritte le principali apparecchiature di un laboratorio di microbiologia dove vengono effettuati controlli ambientali; sono anche descritte le operazioni di base di manutenzione e taratura cui sottoporre le apparecchiature generalmente utilizzate.

2.1. Autoclavi

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

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

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

- *Verifica del livello dell'acqua*
  Prima dell'avvio di un ciclo di sterilizzazione è fondamentale controllare che il livello dell'acqua sul fondo dell'autoclave sia compreso fra l'indice minimo e il massimo riportati sull'indicatore di livello;
- *Verifica funzionale dello sfiato*
  Mentre l'autoclave raggiunge la pressione di esercizio, verificare la tenuta delle valvole manuali di sfiato;
- *Verifica dello stato di conservazione della guarnizione del portello*
  Verificare che non vi siano rotture, scorie o frammenti; lubrificare con grasso al silicone, evitare l'uso di prodotti chimici;
- *Controllo dell'efficienza dei processi di sterilizzazione*
  Utilizzare indicatori biologici come strisce o ampolle di spore di *Bacillus stearothermophilus* normalmente disponibili in commercio. Si consiglia di effettuare questo controllo con frequenza almeno mensile;

- *Ispezione della camera*
  Ispezionare l'interno della camera e del portello dell'autoclave per controllarne lo stato di conservazione; pulire le superfici interne con detergente idoneo per superfici in acciaio rimuovendo eventuali residui e incrostazioni;
- *Verifica dell'efficienza del blocco del portello nelle condizioni di esercizio*
  Controllare che, quando è in corso il ciclo di sterilizzazione, il dispositivo di blocco del portello rimanga bloccato e il portello non si apra;
- *Verifica dell'efficienza del termometro nelle condizioni operative*
  Impostando la temperatura e il tempo di durata dei cicli richiesti, controllare che, quando l'autoclave è in pressione, il valore di temperatura sia conforme a quello riportato sulla tabella di correlazione pressione/temperatura del vapore saturo;
- *Verifica dell'efficienza della valvola di sicurezza*
  Impostare un valore di pressione superiore al valore indicato dall'indice rosso sul manometro e controllare che, prima di raggiungere tale valore, la valvola di sicurezza cominci a sfiatare;
- *Controllo del dispositivo elettronico di livello*
  Mentre l'autoclave è in funzione, scaricare lentamente l'acqua aprendo il rubinetto di scarico e verificare che, raggiunto il livello minimo, intervenga l'allarme e si accenda la spia di segnalazione;
- *Controllo del mantenimento della pulizia esterna dell'autoclave*
  Pulire le superfici esterne con detergente idoneo per superfici in acciaio rimuovendo eventuali residui e incrostazioni.

2.2. Bagni termostatici

I bagni termostatici possono essere utilizzati per mantenere i terreni colturali agarizzati fusi a temperatura controllata oppure per incubare a temperatura in condizioni di elevata umidità e immersione in acqua. Per una buona manutenzione dei bagni termostatici è consigliabile effettuare periodicamente il controllo del livello del liquido nella camera interna, monitorare la temperatura del liquido, sostituire l'acqua contenuta nella vasca e sanitizzare la vasca anche con blandi disinfettanti.

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

2.3. Bilance

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

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

2.4. Cappe per la sicurezza biologica

La maggior parte delle attività di laboratorio, quali la miscelazione, la sonicazione, la frantumazione, l'agitazione, lo scuotimento di materiale infetto, come anche l'isolamento da brodi di coltura, possono inavvertitamente generare bioaerosol pericolosi la cui formazione e dispersione deve essere ridotta al minimo.

È pertanto buona norma, per garantire la qualità del dato analitico e la protezione dell'operatore, eseguire queste operazioni in una cappa di sicurezza biologica di tipo appropriato.

Esistono tre tipi di cappe di sicurezza biologica: classe I, II, e III (Appendice A). La loro efficacia dipende dal flusso dell'aria, dalla capacità di contenimento, dall'integrità dei filtri HEPA (*High Efficiency Particulate Air filter*) e, nel caso delle cappe I e II, dalla loro posizione nella stanza in relazione alle correnti di aria e ai movimenti del personale (vanno poste lontano dalle zone di passaggio e da correnti d'aria provenienti da porte, finestre e dall'impianto di aerazione).

Di norma, per eseguire analisi microbiologiche ambientali che prevedano la ricerca di microrganismi a rischio basso o moderato (gruppi di rischio 1 e 2) vengono utilizzate cappe a flusso laminare di classe I o II.

Le cappe di sicurezza biologica non proteggono le mani dell'operatore in caso di versamenti, punture, tagli o cattiva tecnica di lavoro.

Per le cappe le normali operazioni di manutenzione consistono nella sostituzione dei prefiltri secondo le indicazioni della ditta costruttrice, nella pulizia/disinfezione delle superfici interne con opportuni disinfettanti e nel controllo dell'efficienza dei filtri. Se le cappe sono dotate di sistema a lampade a raggi ultravioletti, è necessario predisporre cicli di accensione a cappa chiusa con successiva attivazione del flusso per garantire l'allontanamento dell'ozono presente in atmosfera.

Verificare periodicamente la presenza di microrganismi nell'aria filtrata esponendo per 30 minuti capsule di Petri aperte contenenti terreni colturali agarizzati per la crescita degli eterotrofi e dei miceti, disposte in punti rappresentativi della superficie di lavoro o, in alternativa, usare contatori di particelle.

Le cappe di sicurezza biologica sono inefficaci per i rischi di natura chimica.

Un corretto uso delle cappe di sicurezza biologica prevede che la cappa sia idonea al campione da trattare, alle operazioni da effettuare e sia perfettamente funzionante:

- spegnere sempre la lampada a raggi UV se l'operatore sta lavorando alla cappa;
- posizionare il vetro frontale, se di tipo a scorrimento, all'altezza fissata per la maggior protezione dell'operatore;
- lasciare in funzione la cappa almeno 10 minuti prima di iniziare a lavorare per stabilizzare il flusso laminare e circa 10 minuti dopo la fine dei lavoro per "pulire" da una eventuale contaminazione aerodispersa;
- ridurre al minimo indispensabile il materiale sul piano di lavoro per non diminuire il passaggio di aria;
- eseguire tutte le operazioni nel mezzo o verso il fondo dei piano di lavoro;
- non introdurre materiale sotto cappa dopo l'inizio dei lavoro; evitare di muovere bruscamente gli avambracci evitare l'utilizzo dei becchi Bunsen. Le alterazioni dei flusso laminare così provocate possono infatti provocare la fuoriuscita di agenti biologici, il calore può anche danneggiare il filtro HEPA;
- rimuovere immediatamente rovesciamenti o fuoriuscite di materiale biologico;

- estrarre dalla cappa il materiale potenzialmente infetto in contenitori chiusi a tenuta, puliti all'esterno ed etichettati con il segnale di rischio biologico; disinfettare le apparecchiature prima di rimuoverle dalla cappa;
- pulire e disinfettare la cappa ogni volta che si termina il lavoro togliendo eventualmente anche il piano forato; utilizzare un disinfettante di provata efficacia nei confronti dei microrganismi eventualmente presenti;
- chiudere il vetro frontale, eventualmente accendere la lampada a raggi UV.

2.5. Dispensatori

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

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

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

2.6. Frigoriferi, celle frigorifere, congelatori

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

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

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

Devono essere effettuate con cadenza periodica operazioni che prevedano:

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

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

2.7. Incubatori

Le normali indicazioni d'uso prevedono la protezione delle pareti dell'incubatore dalla luce solare diretta. È da evitare inoltre l'introduzione di grandi quantità di materiale per lasciar circolare aria nella camera interna.

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

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

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

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

2.8. Incubatori in atmosfera modificata

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

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

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

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

È opportuno controllare il mantenimento delle condizioni della camera interna in relazione allo sviluppo dei microrganismi ricercati. In questo caso è possibile misurare la crescita di batteri riferibili a diverse specie: in un caso, specie inibite dalle condizioni e dalle temperature impostate, nell'altro, specie in grado di crescere nelle condizioni impostate.

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

2.9. Micropipette

Micropipette manuali, elettroniche, monocanale o multicanale sono disponibili in commercio. Si consiglia l'utilizzo di puntali monouso; inoltre è opportuno mantenere la pipetta a temperatura ambiente, evitare che subisca urti, tenerla in posizione verticale e procedere ad una regolare pulizia, manutenzione e taratura, quest'ultima presso enti specializzati.

2.10. Microscopi

Per le normali procedure di analisi microbiologica (es. colorazione di Gram) è sufficiente disporre di un microscopio ottico con obiettivi 10, 40 e 100x, vetrini portaoggetti e coprioggetti e olio ad immersione. Microscopi con caratteristiche particolari (epifluorescenza, stereomicroscopio) possono essere utilizzati per specifiche attività analitiche.

È opportuno collocare i microscopi in posizione stabile. Per il microscopio ottico si consiglia la dotazione di un sistema per l'osservazione in contrasto di fase e di una serie di obiettivi, in

modo da coprire un intervallo di ingrandimenti sufficientemente elevato, e di sistemi per la regolazione dell'intensità luminosa.

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

Quando non in uso, i microscopi vanno tenuti coperti e al riparo dalla luce, per evitare danni alle lenti.

2.11. Misuratori di pH

Gli elettrodi del pHmetro devono essere condizionati e conservati secondo le istruzioni del costruttore.

Dopo ogni uso devono essere puliti con acqua distillata.

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

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

2.12. Termometri

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

3. Materiali

3.1. Capsule di Petri

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

3.2. Membrane filtranti

Generalmente per le analisi microbiologiche si utilizzano membrane con pori aventi un diametro di 0,45 µm (±0,02 µm) e diametro di 47-50 mm. A causa della loro porosità hanno la capacità di trattenere sulla loro superficie, all'atto della filtrazione, i batteri contenuti nell'acqua che svilupperanno colonie sulla superficie della membrana, dopo un idoneo periodo di incubazione, per passaggio per capillarità dei principi del terreno colturale.

In commercio si trovano confezioni già sterili pronte per l'uso, in genere sterilizzate con raggi gamma o con ossido di etilene.

Le membrane si differenziano a seconda della ditta di produzione. In passato, sono stati segnalati problemi nella crescita delle colonie in relazione al tipo di membrane utilizzate. Per evitare, pertanto, l'uso di membrane non idonee, è consigliabile verificarne l'efficienza prima delle analisi.

Registrare la data di ricevimento e il numero di ogni lotto di membrane acquistate e verificare la capacità di sviluppo di colonie batteriche.

3.3. Terreni di coltura

Preferire terreni disidratati in polvere o già pronti in piastra o tubo evitando di preparare i terreni dai singoli ingredienti. In questo caso, i risultati ottenuti dalle analisi potrebbero essere difformi rispetto ad analisi svolte utilizzando terreni disidratati e controllati dal produttore. Inoltre, le procedure di preparazione di terreni per singoli componenti, nel caso di sostanze tossiche, potrebbero costituire un rischio aggiuntivo per la salute degli operatori. In queste circostanze, è necessario adottare particolari cautele nella preparazione dei substrati e utilizzare Dispositivi di Protezione Individuale (DPI). Se i reagenti e i terreni sono preparati in laboratorio per pesata dai costituenti di base, devono essere identificati con una etichetta riportante le seguenti informazioni: eventuale diluizione, data di preparazione, data di scadenza, modalità di conservazione, nome del preparatore, eventuali segnali di pericolosità.

Sulle confezioni di terreni di coltura disidratati e di reattivi (coloranti, additivi, soluzioni) reperibili in commercio, dopo l'arrivo in laboratorio, apporre sia la data di ricevimento che quella di effettiva apertura.

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

- *Controllo della sterilità*
  Porre ad incubare una capsula o un tubo contenenti il solo terreno da testare secondo le modalità previste dal metodo analitico, e verificare la completa assenza di crescita batterica e fungina. In caso contrario, scartare tutto il lotto preparato e controllare le procedure di sterilizzazione e preparazione. Da effettuare ad ogni preparazione del terreno.
- *Controllo della fertilità del terreno*
  Verificare la sua idoneità alla crescita del microrganismo target. Strisciare sulla superficie del terreno agarizzato o inoculare nel brodo un'ansata di una brodocoltura allestita con un ceppo puro certificato di riferimento. Incubare con le modalità previste dal metodo analitico e verificare la crescita di microrganismi con le caratteristiche morfologiche tipiche. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.
- *Controllo della selettività del terreno*
  Verificare l'inibizione di crescita di un microrganismo opportunamente scelto. Strisciare sul terreno agarizzato o inoculare nel brodo un'ansata di brodocoltura allestita a partire da un ceppo puro certificato la cui crescita dovrebbe essere inibita nel substrato in esame. Incubare con le stesse modalità indicate dal metodo analitico e verificare l'assenza di crescita di colonie. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.

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

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

3.4. Vetreria

Flaconi prelievo, beute, cilindri, imbuti, ecc. devono essere conservati al riparo dalla luce e da temperature eccessive, in armadi dedicati. È necessario eliminare la vetreria che presenta rotture anche parziali, per evitare il rischio di ferite durante la manipolazione. Prima dell'eventuale sterilizzazione in laboratorio, dotare i contenitori di tappi adatti all'uso cui sono destinati. Ricoprire i tappi di idonei fogli protettivi.

Per i campionamenti di acque con procedura ad immersione, ricoprire interamente i contenitori di fogli protettivi per garantire la sterilità anche all'esterno e impedire contaminazioni accidentali del campione. Se sterilizzati, al fine di garantire l'immediato riconoscimento della validità della sterilizzazione, contrassegnare il materiale sterilizzato con la data di scadenza. Generalmente, il tempo di scadenza dei materiali di vetreria e degli altri materiali sterilizzati è fissato a tre mesi dalla data di preparazione; trascorso questo tempo, tutta la vetreria dovrebbe essere sottoposta di nuovo a lavaggio e sterilizzazione.

Bibliografia di riferimento

American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd ed. Washington, DC: APHA; 2012.

ISO 7218/Amd.1. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations*. Geneva: International Organization for Standardization; 2001.

Lightfoot NF, Maier EA (Ed.). *Microbiological analysis of food and water: guidelines for quality assurance*. Amsterdam: Elsevier Science; 1998.

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

Ottaviani M, Bonadonna L, Lucentini L, Pettine P. *Requisiti organizzativi e tecnici dei laboratori di verifica della conformità della qualità delle acque*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/18).

UNI CEI 70099. *Vocabolario Internazionale di Metrologia. Concetti fondamentali e generali e termini correlati (VIM).* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.

UNI EN ISO 17994. *Qualità dell'acqua - Criteri per definire una equivalenza tra metodi microbiologici*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004.

UNI EN ISO 7218:2013. *Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2013.

UNI ENV ISO 13843. *Qualità dell'acqua - Guida per la validazione di metodi microbiologici*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.

MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

0. Generalità e definizioni

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

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

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

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

1. Campo di applicazione

La procedura viene utilizzata per il prelievo di campioni di acque di piscina, piscine naturali, e di acque da vasche idromassaggio, *hot tub* e di acque presenti in spa e in strutture termali, e fa riferimento alla norma UNI EN ISO 19458.

2. Prelievo dei campioni

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

Al momento del campionamento è necessario considerare con attenzione i volumi di acqua da prelevare. Essi vanno definiti in funzione dei parametri da determinare e comunque devono essere superiori al minimo necessario per procedere allo svolgimento degli esami richiesti. Nella gran parte dei casi (analisi di routine) è sufficiente prelevare 500 mL di acqua. Per ricerche più approfondite, sono necessari volumi maggiori: i) *Legionella*, *Salmonella*, micobatteri, ecc. il volume minimo è di 1 L; ii) in acque presumibilmente pulite, per virus, *Giardia*, *Cryptosporidium*, amebe, i volumi saranno tra 10 L a diverse centinaia di litri.

Il prelievo dei campioni microbiologici deve essere effettuato con recipienti sterili, a perfetta tenuta, di materiale idoneo e utilizzati solo a questo scopo. Di utilità sono le bottiglie di vetro borosilicato e di materiale plastico (polipropilene, polistirene, polietilene, policarbonato).

Le bottiglie di vetro borosilicato, riutilizzabili, devono comunque essere sterilizzate in condizioni controllate e usando indicatori biologici di controllo in laboratorio a calore secco o a calore umido e utilizzate entro tre mesi dalla sterilizzazione se conservate in condizioni ottimali. controllo dell'efficienza dei processi di sterilizzazione. Per il controllo dell'efficienza dei processi di sterilizzazione, utilizzare indicatori biologici come strisce o ampolle di spore di *Bacillus stearothermophilus* normalmente disponibili in commercio.

Le bottiglie monouso in materiale plastico, già sterili, disponibili in commercio, hanno il vantaggio di essere leggere, resistenti alle variazioni termiche ed economiche; anche in questo caso è necessario attenersi alla data di scadenza indicata dal produttore. Per la raccolta di campioni da analizzare microbiologicamente non possono essere usati contenitori metallici. Per la ricerca di patogeni (virus, parassiti), e quindi eventualmente per la necessità di prelevare grandi volumi di acqua, possono essere utilizzate taniche di plastica, ma più spesso è opportuno effettuare il prelievo/concentrazione del campione *in situ*.

Qualora il campionamento sia effettuato per immersione, i contenitori chiusi dovrebbero essere sterilizzati imballati in fogli protettivi (in genere di alluminio). Aprire la confezione solo al momento del campionamento, preferibilmente utilizzando guanti per limitare contaminazioni esterne e prima di inserirli nell'apposito equipaggiamento sterilizzabile, adatto per l'immersione. L'apparecchiatura più semplice per lo svolgimento del campionamento in profondità è rappresentata da flaconi zavorrati che, immersi chiusi nella massa di acqua, si aprono a comando alla profondità prestabilita. In alternativa, l'esterno delle bottiglie può essere disinfettato (es. con isopropanolo) immediatamente prima dell'immersione in acqua. Infatti,

l'immersione in acqua di qualsiasi attrezzo (tubi, prolunghe, ecc.) non sterile, può rappresentare una fonte di contaminazione.

Le acque di piscina, come quelle di ambienti simili, ma non le acque delle piscine naturali e termali, sono disinfettate e contengono quindi concentrazioni di cloro residuo. Bottiglie/contenitori per i prelievi devono quindi contenere sodio tiosolfato in concentrazione idonea ad inibire l'azione del disinfettante. Ai valori di pH normalmente rilevabili delle acque di piscina e di ambienti simili e con le concentrazioni di cloro generalmente in uso è sufficiente aggiungere una soluzione al 10% di sodio tiosolfato nella quantità di 0,3 mL per ogni 100 mL di capacità della bottiglia in grado di neutralizzare fino a 5 mg/L di cloro residuo libero e combinato. Poiché l'aggiunta, in bottiglie già sterilizzate, di una soluzione, se pure sterile, di neutralizzante può comportare il rischio di una contaminazione, è opportuno che la soluzione venga aggiunta prima della sterilizzazione dei contenitori. Se si utilizzano bottiglie di plastica sterili, aggiungere un'aliquota sterile di sodio tiosolfato in condizioni asettiche.

La presenza di sodio tiosolfato, nelle quantità indicate, non interferisce con i risultati delle analisi microbiologiche. Anche per questo, in occasioni in cui le concentrazioni di cloro siano più alte rispetto a quelle normalmente utilizzate, potrebbe essere necessario utilizzare concentrazioni di sodio tiosolfato proporzionalmente più alte. In commercio sono comunque disponibili bottiglie sterili già contenenti il sodio tiosolfato in concentrazione idonea.

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

Anche prelievi effettuati da rubinetti (es. per l'analisi di acque di immissione devono essere effettuati secondo procedure che consentano di ottenere campioni rappresentativi. I rubinetti devono essere detersi, eliminando depositi, polvere, mucillagini, sostanze grasse, detergenti o agenti disinfettanti e altre sostanze che possono avere influenza sui risultati dell'analisi microbiologica. Dopo la pulizia, è opportuno disinfettare il rubinetto esternamente e internamente rimovendo, se presenti, tubi di plastica e gomma. I rubinetti devono essere disinfettati, eventualmente con la fiamma, ma preferibilmente strofinando con una soluzione di sodio ipoclorito o di sodio dicloroisocianurato (circa 1 g/L), etanolo (al 70%) o isopropanolo (al 70%) prima del campionamento. Poiché hanno effetto corrosivo, le soluzioni vanno utilizzate dagli operatori con particolari cautele e comunque utilizzando DPI. Se vengono in contatto con la pelle, lavare al momento con molta acqua.

Dopo l'uso della soluzione disinfettante, lasciare agire il disinfettante per 2-3 minuti. Sciacquare quindi l'esterno con acqua per assicurarsi che non ci siano più residui di disinfettante. Aprire quindi il rubinetto e fare scorrere l'acqua per un tempo sufficiente (1-3 minuti) a far sì che i disinfettanti vengano eliminati prima della raccolta del campione.

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

Eseguire il prelievo evitando di modificare la portata del flusso durante la raccolta del campione.

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

Il campione prelevato deve essere accompagnato da tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione, quali la data e l'ora del campionamento, il tipo di acqua, la precisa annotazione del punto in cui è stato effettuato il prelievo e devono altresì essere trasmesse, con il campione,

tutte le indicazioni concernenti le eventuali determinazioni effettuate in loco e qualunque altra osservazione possa risultare utile nella interpretazione dei risultati di laboratorio. A parte ogni esigenza di natura giuridica, che può prevedere precise modalità di identificazione del campione, è comunque necessario che il campione venga contrassegnato sia con il codice numerico, sia con l'indicazione in chiaro del punto di campionamento.

Le procedure di prelievo dell'acqua negli impianti natatori dovrebbero fare riferimento alle seguenti modalità:

- acqua di approvvigionamento: prelievo da rubinetto posto su apposito tubo di adduzione;
- acqua di immissione: prelievo da rubinetto posto sui tubi di mandata alle singole vasche a valle degli impianti di trattamento;
- acqua in vasca: prelievo ad una profondità di almeno 30 cm e ad una distanza di 30-50 cm dal bordo vasca. Nei controlli di routine, prelievo nella zona della piscina dove, per l'idraulica, il disinfettante residuo è al livello più basso, lontano da bocchette di immissione. In base alla dimensione e alla forma della piscina, può essere consigliabile prelevare campioni da più punti.

3. Trasporto e conservazione dei campioni

Durante il trasporto e la conservazione di campioni di acqua per l'analisi microbiologica è necessario mantenere la rappresentatività del campione da analizzare e quindi prevenire il decadimento o la ricrescita dei microrganismi presenti. Per quanto possibile, si devono quindi limitare alterazioni che sono spesso inevitabili in un'aliquota ridotta di acqua mantenuta in un contenitore chiuso.

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

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

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

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

Nonostante la necessità di mantenere la temperatura dei campioni di acqua nell'intervallo di valori consigliati, qualora le condizioni ambientali e quelle intrinseche del campione non lo consentano (es. acqua in vasca mantenuta a 30°C), si raccomanda di verificare che la temperatura di conservazione del campione non superi mai quella rilevata all'atto del prelievo.

È comunque preferibile che i campioni "caldi" prelevati dalla vasca o dal ricircolo vengano trasportati separatamente da quelli "freddi" prelevati per l'acqua di approvvigionamento.

Mantenere quindi separati i due tipi contenitori e misurare le temperature per entrambi al momento dell'arrivo in laboratorio.

Fermo restando che il tempo che intercorre tra prelievo e analisi dei campioni, indipendentemente dalla loro natura, deve essere il più breve possibile (possibilmente entro le 12 ore), nel caso di acque di piscina o di ambienti simili, corre l'obbligo di non superare le 24 ore. Quando ciò non sia possibile, almeno per alcune indagini microbiologiche, sarebbe opportuno utilizzare idonei sistemi analitici portatili o laboratori mobili.

Bibliografia di riferimento

American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd ed. Washington DC: APHA; 2012.

Lightfoot NF, Maier EA (Ed.). *Microbiological analysis of food and water: guidelines for quality assurance*. Amsterdam: Elsevier Science; 1998.

UNI EN ISO 19458. *Qualità dell'acqua - Campionamento per analisi microbiologiche*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2006.

DETERMINAZIONE DI *ESCHERICHIA COLI*

0. Generalità

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

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

L'Organizzazione Mondiale della Sanità da oltre 20 anni riconosce la specie *E. coli* come indicatore primario di contaminazione fecale delle acque. Gli studi dell'US EPA hanno inoltre contribuito ad avvalorare la necessità di sostituire, per la valutazione della qualità delle acque, il parametro coliformi fecali con quello di *E. coli*. La scelta, motivata dalla netta predominanza di *E. coli* rispetto agli altri coliformi nel materiale fecale e dalla minore sensibilità del microrganismo alle procedure di disinfezione rispetto alla maggior parte dei batteri patogeni enterici, è stata ormai accreditata da tutta la comunità scientifica internazionale. Tuttavia, i metodi più classici utilizzati per il suo rilevamento, inadeguati per laboriosità e lunghezza d'esecuzione, poiché non formulati per la sua selezione ma per il rilevamento dell'intero gruppo dei coliformi, comportano lunghi tempi per l'acquisizione della risposta. Oltre a ciò, come per i coliformi, parte dei biotipi di *E. coli* presenti nelle acque non sono in grado né di fermentare il lattosio, né di produrre gas nei tradizionali terreni di coltura. Inoltre, alcuni non sono né termotolleranti, né producono indolo in terreni contenenti triptofano. Diversamente, un'alta percentuale di *E. coli*, intorno al 98%, e con l'eccezione dei sierotipi O157:H7 e analoghi, possiede l'enzima β-D-glucuronidasi, oltre che la β-D-galattosidasi, tipico enzima dei coliformi.

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

Nelle acque di piscina, di immissione e in vasca, è prescritta l'assenza obbligatoria di *E. coli* in relazione al suo ruolo di indicatore primario di contaminazione fecale. Il superamento del valore parametrico (*E. coli* 0 in 100 mL) costituisce una non conformità al valore stabilito dall'Accordo del 16 gennaio 2003.

Analogamente nelle acque di ambienti simili, *E. coli*, per il suo ruolo di indicatore di contaminazione fecale, deve risultare assente. Diversamente, per questo parametro, nelle acque di piscine naturali, valori superiori a 0 UFC/100 mL sono previsti in diverse normative europee e in una delibera della provincia di Bolzano del 2011.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS Pi 001A rev. 00 e ISS Pi 001B rev. 00 vengono utilizzate per la determinazione di *E. coli* nelle acque di piscina, di ambienti simili e di piscine naturali.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo ISS Pi 001A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Metodo miniaturizzato MPN a multi-pozzetto. Il metodo consente di determinare la concentrazione di *E. coli* in un determinato volume di acqua. È applicabile all'analisi di acque anche contenenti *E. coli* danneggiati. Il metodo permette di determinare simultaneamente e direttamente la concentrazione di *E. coli* e di coliformi in campioni di acqua tramite una stima statistica calcolata in funzione del numero di pozzetti positivi e negativi ottenuti aggiungendo 100 mL di campione al substrato di crescita. Il risultato può essere ricavato dall'apposita tabella già predisposta (Appendice B). Dopo un periodo di incubazione di circa 18 ore a (36±1)°C si procede alla lettura dei risultati. *E. coli*, idrolizzando il 4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide, produce fluorescenza nei pozzetti gialli quando esposti ad una lampada a luce ultravioletta.

Contemporaneamente, la presenza di coliformi viene evidenziata dalla colorazione gialla che appare nei pozzetti dovuta all'idrolisi dell'O-nitrofenil-β-D-galattopiranoside. Non sono previste prove di conferma.

Il metodo è in linea con la norma ISO 9308:2.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

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

- buste a multi-pozzetto Quanti-Tray™;
- comparatore di riferimento Quanti-Tray™;
- flaconi di plastica con antischiuma (100 mL) oppure flaconi in vetro con chiusura a vite di Schott sterilizzabili in autoclave, sterili;
- lampada di Wood per l'osservazione a 365 nm;
- termosigillatrice automatica Quanti-Tray™.

2.1.3. Volume da analizzare

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

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Colilert Quanti-Tray™

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

Composizione 1		
Alanina	da 0,025 a 0,08	g/L
Arginina	da 0,030 a 0,08	g/L
Acido aspartico	da 0,056 a 0,085	g/L
Cistina	da 0,002 a 0,005	g/L
Acido glutammico	da 0,102 a 0,207	g/L
Glicina	da 0,015 a 0,15	g/L
Istidina	da 0,005 a 0,020	g/L
Isoleucina	da 0,0145 a 0,046	g/L
Leucina	da 0,030 a 0,079	g/L
Lisina	da 0,034 a 0,068	g/L
Metionina	da 0,011 a 0,023	g/L
Fenilalanina	da 0,018 a 0,037	g/L
Prolina	da 0,088 a 0,093	g/L
Serina	da 0,028 a 0,044	g/L
Treonina	da 0,018 a 0,032	g/L
Triptofano	da 0,0036 a 0,005	g/L
Tirosina	da 0,0064 a 0,018	g/L
Valina	da 0,023 a 0,056	g/L
Cobalto	tracce	g/L
Rame	tracce	g/L
Ferro	0,00165	g/L
Piombo	tracce	g/L
Biotina	da 0,00005 a 0,00016	g/L
Colina	da 0,050 a 0,10	g/L
Cianocobalamina	tracce	g/L
Acido folico	da 0,000075 a 0,0014	g/L
Inositolo	da 0,060 a 0,12	g/L
Niacina	da 0,00385 a 0,0070	g/L
Acido nicotinico	da 0,014 a 0,03	g/L
PABA	da 0,020 a 0,038	g/L
Acido pantotenico	da 0,01 a 0,013	g/L
Piridossina	da 0,0015 a 0,0021	g/L
Riboflavina	da 0,0028 a 0,0058	g/L
Tiamina	da 0,0037 a 0,026	g/L
Timidina	da 0,010 a 0,02	g/L
Induttori enzimatici	0,015	g/L

Composizione 2		
Ammonio solfato (anidro)	5,000	g/L
HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico) (senza acido)	6,864	g/L
HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico) (sale di sodio)	5,292	g/L
Acido D-gluconico (sale di calcio)	0,145	g/L
Sodio solfito (anidro)	0,040	g/L
Amfotericina B (solubilizzata) [a]	0,001	g/L
Magnesio solfato (anidro)	0,100	g/L
O-nitrofenil-β-D-galattopiranoside	0,500	g/L
4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide	0,075	g/L
Zinco solfato (eptaidrato)	0,0005	g/L
Manganese solfato	0,0005	g/L
Acido piruvico (sale di sodio)	0,005	g/L
Cloruro di sodio	0,100	g/L
Precursori del DNA	0,005	g/L
Vancomicina	0,005	g/L
Cefsulodina	0,011	g/L
Precursori degli aminoacidi	0,001	g/L
Fonti di fosfato	0,1	g/L

[a] Concentrazione finale dell' Amfotericina B dopo aver tenuto conto della concentrazione della soluzione. Le quantità degli elementi in traccia sono discrezionali e includono quantità inferiori a 0,001 g/L. Anche le quantità delle vitamine in traccia sono discrezionali e includono quantità inferiori a 0,5 µg/g.

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

Il prodotto è certificato come non tossico.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Miscelazione del campione

Aggiungere il terreno disidratato ad un volume di 100 mL del campione da analizzare. Miscelare con cura e, dopo che la polvere si è completamente sciolta, attendere qualche minuto. Per la procedura di valutazione della presenza/assenza di *E. coli* incubare direttamente il recipiente a (36±1)°C per 18 ore (fino a un massimo di 22 ore). Per la procedura di enumerazione versare la soluzione così ottenuta in una busta a multi-pozzetto Quanti-Tray™. Sigillare la busta inserendola nella termosigillatrice automatica Quanti-Tray™. La busta viene sigillata in 15 secondi.

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

2.1.6. Interpretazione dei risultati

Dopo incubazione, contare il numero di pozzetti gialli che risultano fluorescenti (sul retro della busta segnare con un pennarello i pozzetti gialli in corrispondenza dei quali dovrà essere verificata la fluorescenza) quando esposti alla luce della lampada di Wood e calcolare il valore MPN facendo riferimento alla relativa Tabella in Appendice B.

Se opportuno, in caso di riscontro di pozzetti incolori ma fluorescenti, procedere all'isolamento e all'identificazione dei microrganismi presenti all'interno dei pozzetti al fine di verificare la presenza eventuale di biotipi rari di *E. coli* β-galattosidasi negativi ma β-D-glucuronidasi positivi.

Risultati positivi ottenuti prima delle 18 ore di incubazione, come anche risultati negativi osservati dopo le 22 ore, sono da considerarsi validi. Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 31488 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 o 27853; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.7. Espressione dei risultati

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

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

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

2.1.8. Prestazioni del metodo

Sono disponibili dati di validazione del metodo ottenuti in base alle norme specifiche e dati di equivalenza in base alla norma UNI EN ISO 17994.

2.2. Metodo ISS Pi 001B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri appartenenti alla specie *E. coli* che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene. Dopo incubazione alla temperatura di (44±1)°C per (18÷24) ore.

L'analisi è semplice da eseguire, ma il terreno non è stato saggiato per questa specifica matrice. In uno studio di comparazione eseguito su acque disinfettate era tuttavia emerso che il substrato potesse sottostimare il carico microbico. Prima dell'utilizzo, verificare l'efficacia del metodo con prove comparative.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

2.2.3. Volume da analizzare

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

2.2.4. Terreni di coltura e reagenti

2.2.4.1. Tryptone Bile X-Glucuronide Agar

Composizione		
Triptone	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±3)°C per 15 min. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5±3)°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali. Il terreno non è classificabile come pericoloso ai sensi della legislazione vigente ma contiene sali biliari (classificabili come Xi-Irritanti) ad una concentrazioni >1%. Come per tutti i terreni in polvere anche la sua manipolazione deve essere effettuata con una adeguata protezione delle vie respiratorie. Non ingerire.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Filtrazione

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con pori di 0,45 µm di diametro (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici da 0,7/0,2 µm). Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento Triptone Bile X Glucuronide Agar (2.2.4.1) e procedere all'incubazione a (44±1)°C per (18÷24) ore.

2.2.6. Lettura e interpretazione dei risultati

E. coli sviluppa colonie tipiche di colore verde-blu.

2.27. Espressione dei risultati

Il numero di *E. 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).

Bibliografia di riferimento

American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd ed .Washington, DC: APHA; 2012.

APAT/IRSA-CNR. *Metodi Analitici per le Acque. 29/2003*. Roma: APAT/IRSA-CNR; 2003.

Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of AOAC*. 16th ed.; 1995.

ISO 29201. Water quality – The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.

ISO 9308-2. Water quality - Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria – Part 2: most probable number method. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.

Italia. 16 gennaio 2003. Accordo tra il Ministero della Salute, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano sugli aspetti igienico-sanitari per la costruzione, la manutenzione e la vigilanza delle piscine ad uso natatorio. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 51, 3 marzo 2003.

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

UNI 10674. Acque destinate al consumo umano – Guida generale per determinazioni microbiologiche. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.

UNI EN ISO 17994. Water quality - Criteria for establishing equivalence between microbiological methods. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004.

UNI EN ISO 8199 – Water quality –General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.

UNI ENV ISO 13843. *Qualità dell'acqua – Guida per la validazione di metodi microbiologici.* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.

DETERMINAZIONE DEGLI ENTEROCOCCHI

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Enterococchi rilevato con i metodi ISS Pi 002A rev. 00; ISS Pi 002B rev. 00.

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

Gli enterococchi sono cocchi gram positivi, catalasi negativi, del diametro di circa 1 μm, disposti singolarmente, oppure in coppie o, più frequentemente, a catena, anaerobi facoltativi e immobili, con l'eccezione di *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. sulfureus*, provvisti dell'antigene D.

Alcune specie si presentano dotate di capsula, mentre altre risultano elaborare un particolare e caratteristico pigmento giallo (*E. casseliflavus* ed *E. flavescens*). Risultano sia α- che β-emolitici se coltivati in agar sangue (terreni addizionati di sangue proveniente da pecora o bovino) con l'eccezione di *E. faecalis* che risulta talvolta privo di attività emolitica.

Il genere comprende specie determinate sulla base delle sequenze della subunità 16S dell'rRNA che hanno permesso di individuare la presenza di specie di gruppo. Le specie appartenenti al genere *Enterococcus*, che vengono definite in grado di ridurre il 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro a formazano e di idrolizzare l'esculina a 44°C, soddisfano specifici requisiti: crescita a 10÷45°C, resistenza a 60°C per 30 minuti, crescita a pH 9,6 e al 6,5% di NaCl, idrolisi del 4-metilumbelliferil-β-D-glucoside in presenza di tallio acetato, acido nalidixico e 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro.

Gruppi diversi sono stati individuati in questo genere e comprendono le specie *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii* (primo gruppo); *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* ed *E. malodoratus* (secondo gruppo); *E. casseliflavus* ed *E. gallinarum* (terzo gruppo) *E. faecalis*, *E. cecorum*, *E. colombae* ed *E. saccharolyticus*, che hanno tra loro una bassa similarità genotipica, sono stati inseriti in un quarto gruppo.

L'appartenenza al genere *Enterococcus* di specie diverse anche dal punto di vista molecolare comporta difficoltà nell'individuare test fenotipici capaci di identificare il genere. Anche il test più comunemente utilizzato per una conferma dell'appartenenza al gruppo, l'idrolisi dell'esculina, se ancora utile a individuare anche le nuove specie del genere *Enterococcus*, fornisce comunque reazione positiva anche per microrganismi appartenenti ai generi *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* e *Leuconostoc*.

Secondo la nuova tassonomia, nel genere *Streptococcus* si individuano gli streptococchi orali, gran parte dei quali opportunisti patogeni e poco adattabili alla sopravvivenza nell'intestino e gli streptococchi di prevalente derivazione animale con habitat intestinale. Le specie che vengono comprese in quest'ultimo sottogruppo (*S. bovis*, *S. equinus*, *S. alactolyticus*, *S. suis*, *S. intestinalis*, *S. hyointestinalis*) hanno caratteristiche diverse dal punto di vista genotipico e differente significato sanitario. La loro proporzione è diversa nelle feci delle diverse specie animali e comunque sempre prevalente rispetto alla loro concentrazione nelle feci umane. Tuttavia, se differenze delle concentrazioni nelle feci umane e animali avevano

precedentemente consentito di avanzare l'ipotesi di ottenere indicazioni sulla origine fecale dell'inquinamento, anche sulla base del rapporto tra i due indicatori, coliformi e streptococchi, è stato dimostrato che la valutazione delle proporzioni tra gli indicatori, per stabilire l'origine della contaminazione, può portare a conclusioni e interpretazioni errate. Infatti, è stato calcolato che, a causa della diversa capacità di sopravvivenza nelle acque da parte dei microrganismi considerati e della maggiore resistenza all'azione dei disinfettanti da parte del gruppo degli enterococchi/streptococchi, la proporzione numerica tra i due gruppi di indicatori è comunque alterata soprattutto in acque trattate e disinfettate.

La presenza di enterococchi nelle acque di piscina è segnalata raramente. Valutazioni diverse potrebbero riguardare acque in ambienti simili e in piscine naturali. Evenienze di questo tipo sono comunque da mettere in relazione a sicura contaminazione di origine fecale, dovuta ad infiltrazioni dall'esterno, a fenomeni di cross-connection o più frequentemente a diffusione di materiale fecale in vasca. Inoltre, gli enterococchi nelle acque sono un segnale della ridotta efficienza del sistema di trattamento delle acque.

Negli ultimi anni sono stati formulati metodi rapidi per la ricerca dei microrganismi appartenenti al genere *Enterococcus* basati sull'idrolisi enzimatica di sostanze cromofore o fluorofore, e che non necessitano dello svolgimento di prove di conferma. Questo comporta una maggiore rapidità nella risposta delle analisi a cui si aggiunge la semplicità di applicazione non comportando modifiche sostanziali alle normali pratiche di routine.

I metodi più classici sono comunque da ritenersi ancora validi anche se tuttora comportano lo svolgimento di prove aggiuntive per l'accertamento dell'appartenenza al genere.

Nelle acque di piscina è prescritta l'assenza obbligatoria degli enterococchi in relazione al loro ruolo di indicatori di contaminazione fecale. Il superamento del valore parametrico (Enterococchi 0 in 100 mL) costituisce una non conformità al valore stabilito dall'Accordo del 16 gennaio 2003. Analogamente nelle acque di ambienti simili, gli enterococchi, per il loro ruolo di indicatori di contaminazione fecale, devono risultare assenti. Diversamente, per questo parametro, nelle acque di piscine naturali, valori superiori a 0 UFC/100 mL sono previsti in diverse normative europee e in una delibera della provincia di Bolzano del 2011.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS Pi 002A rev. 00 e ISS Pi 002B rev. 00 vengono utilizzate per la determinazione degli enterococchi nelle acque di piscina, di ambienti simili e di piscine naturali.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo ISS Pi 002A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

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

Il metodo è in linea con la norma UNI EN ISO 7899-2.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

2.1.3. Volume da analizzare

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

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Terreno di base di Slanetz e Bartley

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

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata. Sciogliere il terreno in acqua distillata secondo le istruzioni della ditta produttrice. A 1 L di terreno, aggiungere sterilmente 10 mL di soluzione di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) (2.1.4.2.), miscelando con cura. Non sterilizzare. In alcune formulazioni il terreno ha già tra i suoi componenti il TTC.

Il terreno è classificato come Xn – Nocivo per la presenza di sodio azide. È pericoloso per inalazione. La scheda di sicurezza, a cui è necessario fare riferimento, informa che l'azide sodica, presente nel terreno, può avere effetti irritanti per gli occhi e per la pelle. Durante la manipolazione e lo smaltimento è necessario adottare particolari precauzioni: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

2.1.4.2. Soluzione di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro

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

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

2.1.4.3. Terreno completo di Slanetz e Bartley

Composizione		
Terreno di base (2.1.4.1.)	1000	mL
2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (2.1.4.2.)	10	mL
pH 7,2±0,2		

Aggiungere 10 mL di soluzione di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro ad 1 L di terreno di base mantenuto fuso a (50±5)°C. Nel caso sia necessario correggere il pH, utilizzare una soluzione di

sodio carbonato (100 g/L) o di sodio idrossido (40 g/L) o di acido cloridrico (36,5 g/L). Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5±3)°C al riparo dalla luce per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

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

2.1.4.4. Terreno all'Esculina Bile Azide Agar

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

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

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Filtrazione e incubazione

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45 µm (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici da 0,7/0,2 µm). Porre la membrana sulla superficie del terreno di Slanetz e Bartley (2.1.4.3.) e procedere all'incubazione a (36±1)°C per (40÷48) ore.

2.1.5.2. Identificazione e conteggio delle colonie

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

2.1.6. Conferma

2.1.6.1. Prova dell'idrolisi dell'esculina

In presenza di colonie tipiche, trasferire la membrana sul terreno all'Esculina Bile Azide Agar (2.1.4.4.) pre-riscaldato a 44°C. Incubare a (44±1)°C per 2 ore. Dopo incubazione si considerano positive le colonie in corrispondenza delle quali, sul retro della membrana, sul terreno all'esculina compare un alone nero-marrone. È possibile prolungare l'incubazione oltre le 2 ore, in quanto alcuni stipiti si possono dimostrare lenti a idrolizzare l'esculina.

2.1.7. Espressione dei risultati

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

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

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

dove:

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

2.2. Metodo ISS Pi 002B rev.00

2.2.1. Principio del metodo

Metodo miniaturizzato MPN a multi-pozzetto. Il metodo consente di determinare la concentrazione di Enterococchi in un determinato volume di acqua. È applicabile anche all'analisi di acque contenenti Enterococchi danneggiati. Il metodo permette di determinare la concentrazione di Enterococchi in campioni di acqua tramite una stima statistica calcolata in funzione del numero di pozzetti positivi e negativi ottenuti aggiungendo 100 mL di campione al substrato di crescita. Il risultato può essere ricavato dall'apposita tabella già predisposta (Appendice B.). Dopo un periodo di incubazione di circa 24 – 28 ore a (41±1)°C si procede alla lettura dei risultati. Quando il substrato enzimatico orto-nitrofenil-β-D-glucoside viene metabolizzato dagli enterococchi, il colore dei pozzetti passa da blu a verde, indicando positività della reazione. Qualsiasi variazione del colore originale verso il colore verde viene considerata un risultato positivo. Non è necessario utilizzare la luce UV.

Non sono previste prove di conferma.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

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

- buste a pozzetto Quanti-Tray™;
- comparatore di riferimento Quanti-Tray™;
- flaconi di plastica con antischiuma (100 mL) oppure flaconi in vetro con chiusura a vite di Schott sterilizzabili in autoclave, sterili);
- termosigillatrice automatica Quanti-Tray™;

2.2.3. Volume da analizzare

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

2.2.4. Terreni di coltura e reagenti

2.2.4.1. Enterolert DW Quanti-Tray ™

Composizione		
Exp-fosfato monobasico di sodio	0,12	g
Sodio fosfato dibasico anidro	3,06	g
Fosfato diidrossido	1	g
Sodio bicarbonato	2	g
Peptone	1,5	g
Terreno al lievito	5,45	g
O-nitrofenil β-d-glucopiranoside	0,3	g
Sale di sodio dell'acido piruvico	0,5	g
Magnesio solfato	0,24	g
Miscela selettiva	0,169	g
Verde FCF certificato	0,001	g

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

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

Il prodotto è certificato come non tossico.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Miscelazione del campione

Aggiungere il terreno disidratato ad un volume di 100 mL del campione da analizzare. Miscelare con cura e, dopo che la polvere si è completamente disciolta, attendere qualche minuto. Per la procedura di valutazione della presenza/assenza degli Enterococchi, incubare direttamente il recipiente a (41±1)°C per 24 ore (fino a un massimo di 28 ore). Per la procedura di enumerazione, versare la soluzione così ottenuta in una busta a multi-pozzetto Quanti-Tray™. Sigillare la busta inserendola nella termosigillatrice automatica Quanti-Tray™. La busta viene sigillata in 15 secondi. Incubare a (41±1)°C per 24 ore (fino a un massimo di 28 ore). Non sono richieste prove di conferma.

2.2.6. Interpretazione dei risultati

I risultati sono definitivi dopo 24-28 ore. Per acque disinfettate è preferibile effettuare la lettura a 28 ore.

Dopo incubazione, contare il numero di pozzetti blu e calcolare il valore MPN facendo riferimento alla relativa Tabella in Appendice B.

Per i controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Enterococcus faecium* ATCC 35667 e come controllo negativo *Serratia marcescens* ATCC 43862, in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

2.2.7. Espressione dei risultati

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

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

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

2.2.8. Prestazioni del metodo

Sono disponibili dati di validazione del metodo ottenuti in base alle norme specifiche e dati di equivalenza in base alla norma UNI EN ISO 17994.

Bibliografia di riferimento

Bonadonna L, Briancesco R, Paradiso R, Semproni M. Validità di metodi utilizzati per la determinazione di enterococchi intestinali in acque destinate al consumo umano. *Biol Amb* 27(2013):1-8.

Figarolli BM, Ossiprandi MC. Ceppi antibiotico-resistenti di *Enterococcus*. *Ann Fac Medic Vet di Parma* 2006;Vol. XXVI:219-234.

ISO 29201. *Water quality – The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods*. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.

Italia. 16 gennaio 2003. Accordo tra il Ministero della Salute, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano sugli aspetti igienico-sanitari per la costruzione, la manutenzione e la vigilanza delle piscine ad uso natatorio. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 51, 3 marzo 2003.

Leclerc H, Devriese LA, and Mossel DAA. Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J Appl Bacteriol* 1996;81:459-66.

UNI 10674. *Acque destinate al consumo umano – Guida generale per determinazioni microbiologiche.* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.

UNI ENV ISO 13843. *Qualità dell'acqua – Guida per la validazione di metodi microbiologici.* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.

UNI EN ISO 17994. *Water quality - Criteria for establishing equivalence between microbiological methods*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004.

UNI EN ISO 7899-2. *Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione degli enterococchi intestinali – Parte 2. Metodo di filtrazione su membrana*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.

UNI EN ISO 8199 – *Water quality –General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture.* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.

DETERMINAZIONE DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Pseudomonas aeruginosa* rilevato con i metodi ISS Pi 003A rev. 00; ISS Pi 003B rev. 00.

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

P. aeruginosa è un microrganismo caratterizzato da una elevata capacità di adattamento. Si rileva in tutti i tipi di acque e in generale, in tutti gli ambienti umidi. Inoltre, è in grado di crescere in acqua distillata e di sopravvivere nei disinfettanti blandi. Si moltiplica facilmente, raggiungendo concentrazioni elevate, anche nelle acque oligotrofe dove la sua presenza è comunque difficilmente correlabile a quella degli indicatori di contaminazione fecale. Rappresenta uno dei microrganismi tipici dei biofilm. Infatti, è in grado di aderire a superfici umide o in contatto con liquidi grazie alla produzione, da parte di ceppi mucoidi o non mucoidi, di lipopolisaccaridi e glicoproteine extracellulari. Generalmente, nelle acque clorate *P. aeruginosa* viene evidenziato quando la concentrazione di cloro residuo è inferiore a 1 mg/L.

Per causare gastroenteriti la dose infettante è particolarmente elevata e pari a 10^9 organismi nei soggetti immunocompetenti. Le infezioni possono più spesso essere correlate a frequentazione di piscine, o di ambienti simili, e a uso di soluzioni per lenti a contatto. In questi casi, il microrganismo è quindi responsabile di otiti, di infezioni cutanee e oculari.

Negli ultimi anni sono stati formulati metodi rapidi per la ricerca della specie *P. aeruginosa* basati sul rilevamento di specifiche attività enzimatiche che permettono di non svolgere prove di conferma ulteriori. Infatti, i metodi più classici hanno alcuni limiti legati soprattutto alla necessità di svolgere elaborate e lunghe prove addizionali per l'accertamento dell'appartenenza al genere, con conseguente allungamento dei tempi di risposta delle analisi.

La ricerca di *P. aeruginosa* nei controlli delle acque di piscina e di ambienti simili ha, oltre alla valenza legata alla verifica dell'efficacia del trattamento a cui sono soggette le acque, anche rilevanza per il ruolo del batterio come patogeno opportunista, potenzialmente in grado di moltiplicarsi nelle acque.

Nell'acqua di immissione in vasca è prescritta l'assenza obbligatoria di *P. aeruginosa*, in 100 mL; un valore di ≤ 1 UFC in 100 mL è previsto per l'acqua in vasca. Il superamento del valore parametrico costituisce una non conformità al valore stabilito dall'Accordo del 16 gennaio 2003. La presenza di altre specie di *Pseudomonas* nelle acque non ha una analoga rilevanza sanitaria. Per le piscine naturali, in mancanza di una regolamentazione nazionale, *P. aeruginosa* potrebbe rispondere ai requisiti stabiliti da normative europee e da una delibera della provincia di Bolzano del 2011, che prescrivono un valore soglia di 10 UFC/100 mL.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS Pi 003A rev. 00 e ISS Pi 003B rev. 00 vengono utilizzate per la determinazione di *P. aeruginosa* nelle acque di piscina e ambienti simili e di piscine naturali.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo ISS Pi 003A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

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

Il metodo è in linea con la norma UNI EN ISO 16266.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

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

2.1.3. Volume da analizzare

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

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Terreno di base Pseudomonas Agar

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

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata secondo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per 15 minuti. Raffreddare a (50±5)°C. Aggiungere il supplemento (2.1.4.2.).

2.1.4.2. Supplemento CN

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

Il supplemento è disponibile in commercio. Ricostituire in 4 mL di acqua distillata sterile. Aggiungere il supplemento asetticamente a 1 L di terreno di base (2.1.4.1.) raffreddato e mescolare.

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

2.1.4.3. Terreno completo Pseudomonas Agar/CN

Composizione		
Terreno di base Pseudomonas Agar	1000	mL
Supplemento CN	4	mL
pH 7,1±0,2		

Aggiungere ad 1 L di terreno di base (2.1.4.1.) 4 mL di supplemento (2.1.4.2.). Agitare per ottenere una soluzione omogenea e, rispettando le comuni regole di asepsi, distribuire in capsule di Petri. Non mantenere fuso il terreno per più di 4 ore.

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

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

2.1.4.4. Terreno B di King

Composizione		
Peptone	20	g
Dipotassio idrogeno fosfato	1,5	g
Magnesio solfato eptaidrato	1,5	g
Glicerolo	10	mL
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata secondo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere una soluzione omogenea e, rispettando le comuni regole di asepsi, distribuire in tubi in ragione di 5 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per 15 minuti. Conservare a (5±3)°C a riparo dalla luce per non più di tre mesi in condizioni ottimali.

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

2.1.4.5. Brodo all'acetamide – Soluzione A

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

Sciogliere gli ingredienti in acqua distillata.

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

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

2.1.4.6. Brodo all'acetamide – Soluzione B

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

Sciogliere gli ingredienti in acqua distillata.

2.1.4.7. Brodo all'acetamide – Soluzione completa

Composizione		
Soluzione A (2.1.4.5.)	900	mL
Soluzione B (2.1.4.6.)	1	mL
Acqua distillata		

Aggiungere a 900 mL di soluzione A (2.1.4.5.) 1 mL di soluzione B (2.1.4.6.) e portare a volume di 1 L con acqua distillata mescolando continuamente. Distribuire in tubi in ragione di 5 mL/tubo e sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per 15 minuti. Conservare a (5±3)°C a riparo dalla luce per non più di tre mesi in condizioni ottimali.

2.1.4.8. Agar Nutritivo

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

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

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

2.1.4.9. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Composizione		
N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto, come diammina aromatica, viene classificato come sostanza tossica e nociva.

2.1.4.10. Reattivo di Nessler

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

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

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

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Filtrazione e incubazione

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45 µm (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici da 0,7/0,2 µm). Porre la membrana sulla superficie del terreno di isolamento (2.1.4.3.) e procedere all'incubazione a (36±1)°C per (40÷48) ore.

2.1.5.2. Identificazione delle colonie

Verificare dopo (22±2) ore e dopo (44±4) ore la crescita di colonie tipiche sul terreno di isolamento (2.1.4.3.) esaminando la membrana sotto la lampada di Wood. *P. aeruginosa* può sviluppare colonie di colore verde-blu che producono piocianina, fluorescenti e marrone-rossastro.

Contare tutte le colonie di colore verde-blu e fluorescenti alla lampada di Wood e considerarle come colonie confermate di *P. aeruginosa*.

Sottoporre a conferma tutte le colonie risultate fluorescenti, ma non verdi, alla lampada di Wood (*P. aeruginosa* presuntivo), procedendo alla verifica della produzione di ammonio da acetamide. Sottoporre a conferma le colonie che hanno prodotto un pigmento di colore marrone-rossastro (*P. aeruginosa* presuntivo), procedendo all'esecuzione delle prove relative alla produzione di ammonio da acetamide, alla verifica della presenza della citocromossidasi, alla produzione di fluorescenza.

Circa il 10% dei biotipi di *P. aeruginosa* non produce pigmento.

Non esporre troppo a lungo le colonie alla luce ultravioletta onde evitare danni ai microrganismi che potrebbero essere resi non vitali, inficiando quindi le prove successive.

2.1.5.3. Conferma

Oltre alla verifica della produzione di ammonio da acetamide, così come previsto dalla norma UNI EN ISO 16266, come prove aggiuntive opzionali è consigliabile sottoporre le colonie risultate fluorescenti alla verifica della presenza dell'enzima citocromossidasi e della crescita a 42°C.

Analogamente, in base alla norma anche per le colonie di colore marrone-rossastro che non fluorescono (presuntive), oltre alla verifica della produzione di ammonio da acetamide, sono previsti i seguenti test: verifica della presenza della citocromossidasi, crescita sul terreno B di King con produzione di fluorescenza alla lampada di Wood. Inoltre, è consigliabile verificare la crescita a 42°C.

In Tabella 1 sono riassunte le morfologie delle colonie con le relative prove di conferma richieste.

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

Prima di effettuare ciascuna prova di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare, preferibilmente, tutte o comunque un numero rappresentativo di colonie sospette su Agar Nutritivo (2.1.4.8.) incubando a (36±1)°C per (22±2) ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

Tabella 1. Prove di conferma richieste per le colonie cresciute Pseudomonas Agar/CN

Prove di conferma	Colonie caratteristiche su Pseudomonas Agar/CN		
	blu-verdi	solo fluorescenti	marrone-rossastre
Produzione di ammonio da acetamide	tnn	+	+
Produzione di citocromossidasi	tnn	tnn	+
Fluorescenza su King B	tnn	tnn	+
Pseudomonas aeruginosa	confermato	confermato	confermato

tnn: test non necessario; + : test positivo

2.1.5.4. Verifica della produzione di ammonio

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

Inoculare ciascuna colonia sospetta cresciuta su Agar Nutritivo (2.1.4.8.) in un tubo contenente il Brodo all'acetamide (2.1.4.7.) e incubare a (36±1)°C per (22±2) ore. Dopo incubazione aggiungere 1-2 gocce di Reattivo di Nessler (2.1.4.10.) e verificare la produzione di ammonio che si manifesta con una colorazione compresa tra il giallo e il rosso-mattone.

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

2.1.5.5. Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti alla specie *P. aeruginosa* in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. Prelevare dall'Agar Nutritivo (2.1.4.8.), seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile le colonie che, in primo isolamento, avevano prodotto un pigmento marrone-rossastro e strisciarle su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.1.4.9.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti

all'uopo distribuiti in commercio. I microrganismi citocromossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi. Una reazione negativa si manifesta con il mancato sviluppo di colore.

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

2.1.5.6. Verifica della produzione di fluorescenza

Seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, prelevare dall'Agar Nutritivo (2.1.4.8.) le colonie che, in primo isolamento, avevano prodotto un pigmento marrone-rossastro e che sono risultate citocromossidasi-positive e positive per la produzione di ammonio e isolarle sul terreno B di King (2.1.4.4.).

Incubare fino a un massimo di 5 giorni a (36±1)°C, sebbene l'eventuale positività della prova possa essere, generalmente, già evidenziabile dopo 24 ore di incubazione. Pertanto, è opportuno osservare giornalmente, con la lampada di Wood, la presenza di fluorescenza e registrare come positiva qualsiasi fluorescenza che compare entro i 5 giorni.

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

2.1.5.7. Prova della crescita a 42°C (opzionale)

Prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta, strisciarla su Agar Nutritivo (2.1.4.8.) e incubare a (41÷43)°C per (48±2) ore. I microrganismi appartenenti alla specie *P. aeruginosa* sono in grado di crescere a questa temperatura di incubazione, come anche la specie *P. mendocina*. Il risultato è positivo quando si ha lo sviluppo della colonia.

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

2.1.6. Espressione dei risultati

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

Esprimere i risultati in funzione del volume di riferimento specifico per la tipologia di acqua analizzata, considerando che per le acque di piscina il valore deve essere riferito a 100 mL.

Calcolare il numero di microrganismi presenti secondo la seguente formula:

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

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

2.2. Metodo ISS Pi 003B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Metodo miniaturizzato MPN a multi-pozzetto. Il metodo consente di determinare la concentrazione di *Pseudomonas aeruginosa* in un determinato volume di acqua. È applicabile all'analisi di acque anche contenenti *P. aeruginosa* danneggiati.

Il metodo permette di determinare la concentrazione di *P. aeruginosa* in campioni di acqua tramite una stima statistica calcolata in funzione del numero di pozzetti positivi e negativi ottenuti aggiungendo 100 mL di campione al substrato di crescita. Il risultato può essere ricavato dall'apposita tabella già predisposta (Appendice B). Dopo un periodo di incubazione di 24÷28 ore a (38±1)°C procedere alla lettura dei risultati. Per acque disinfettate è consigliabile prolungare l'incubazione fino alle 28 ore per la presenza di *P. aeruginosa* danneggiati o stressati. I ceppi di *P. aeruginosa*, che possiedono l'enzima specifico, sono in grado di idrolizzare il substrato con conseguente liberazione di un composto che emette una fluorescenza blu se osservata sotto la lampada a luce ultravioletta. La comparsa anche di una fluorescenza debole viene considerata un risultato positivo.

Non sono previste prove di conferma.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

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

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

2.2.3. Volume da analizzare

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

2.2.4. Terreni di coltura e reagenti

2.2.4.1. Pseudalert Quanti-Tray™

Composizione		
Nutrienti (amminoacidi, vitamine ed elementi in tracce)	5	g
Tampone	12,15	g
Sodio cloruro	5	g
Magnesio solfato	1	g
Indicatori di crescita	82	mg
Antibiotici	68,4	g
Fonte di azoto	1,2	g

Il terreno si trova anche in commercio in fiale già predosate per l'esame di 100 mL di campione (o una sua diluizione). Il prodotto sotto forma granulare, si mantiene 12 mesi dalla data di produzione. Conservare le fiale a 2÷30°C, preferibilmente al buio.

Nell'esecuzione dell'analisi seguire le istruzioni della ditta produttrice e attenersi alle comuni norme di sicurezza previste per i laboratori di microbiologia. Il prodotto è certificato come non tossico.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Miscelazione del campione

Aggiungere il terreno disidratato a un volume di 100 mL del campione da analizzare. Miscelare con cura e, dopo la dissoluzione della polvere, attendere qualche minuto. Per la procedura di valutazione della presenza/assenza di *P. aeruginosa*, incubare direttamente il recipiente a (38±1)°C per 24 ore (e in ogni caso, per un periodo non superiore a 28 ore). Per la procedura di enumerazione versare la soluzione ottenuta in una busta a multi-pozzetto Quanti-Tray™. Sigillare la busta inserendola nella termosigillatrice automatica Quanti-Tray™. La busta viene sigillata in 15 secondi. Incubare a (38±1)°C per 24 ore (fino ad un massimo di 28 ore). Non sono previste prove di conferma.

2.2.6. Interpretazione dei risultati

Dopo incubazione, contare il numero di pozzetti che emettono una fluorescenza blu (anche debole) quando esposti alla luce ultravioletta e calcolare il valore MPN facendo riferimento alla relativa Tabella in Appendice B. I pozzetti positivi manifestano la presenza di *P. aeruginosa* confermato.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *P. aeruginosa* ATCC 27853 o ATCC 10145 e come controllo negativo *E. coli* ATCC 25922 o *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

2.2.7. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come MPN/100 mL, considerando l'eventuale diluizione qualora il campione non sia stato analizzato tal quale. Nell'evenienza in cui non risultino pozzetti positivi (risultato ottenuto in base alla Tabella in Appendice B <1/100 mL), l'analisi va considerata statisticamente equivalente ad un test di P/A (Presenza/Assenza). In questo caso riportare quindi il risultato come 0/100 mL. Bisogna considerare che, qualora si ottenga un valore non intero, si ritiene comunque indispensabile approssimare all'unità il risultato, per difetto quando il valore della parte decimale sia < 0,5, altrimenti per eccesso.

2.2.8. Prestazioni del metodo

Sono disponibili dati di validazione del metodo ottenuti in base alle norme specifiche e dati di equivalenza in base alla norma UNI EN ISO 17994.

Bibliografia di riferimento

Allen M, Edberg S, and Reasoner D. Heterotrophic plate count (HPC) bacteria – What is their significance in drinking water? In: *Proceedings of the NFS International/WHO Symposium on Bacteria in drinking water. Public health implications?* Geneva, 24-27 aprile 2002. Geneva: OMS; 2003. p. 29-33.

ISO 29201. *Water quality – The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods*. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.

Italia. 16 gennaio 2003. Accordo tra il Ministero della Salute, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano sugli aspetti igienico-sanitari per la costruzione, la manutenzione e la vigilanza delle piscine ad uso natatorio. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 51, 3 marzo 2003.

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

UNI 10674. *Acque destinate al consumo umano – Guida generale per determinazioni microbiologiche.* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.

UNI EN ISO 16266. *Qualità dell'acqua - Ricerca e conteggio di Pseudomonas aeruginosa attraverso la filtrazione su membrana*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.

UNI EN ISO 17994. *Water quality - Criteria for establishing equivalence between microbiological methods*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004.

UNI EN ISO 8199 – *Water quality –General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture.* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.

UNI ENV ISO 13843. *Qualità dell'acqua – Guida per la validazione di metodi microbiologici.* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.

DETERMINAZIONE DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Staphylococcus aureus* rilevato con i metodi ISS Pi 004A rev. 00, ISS Pi 004B rev. 00 e ISS Pi 004C rev. 00.

Staphylococcus aureus è un batterio di forma sferica (0,5-1 μm di diametro), Gram-positivo, immobile, privo di capsula, asporigeno, alodurico, anaerobio facoltativo, catalasi positivo, chemorganotrofo appartenente al genere *Staphylococcus* e alla famiglia delle *Staphylococcaceae*. Molte specie sono cromogene, anaerobi facoltativi, generalmente catalasi positivi, chemorganotrofi. Il genere *Staphylococcus* comprende attualmente 47 specie, di cui almeno 18 isolate dall'organismo umano. Gli stafilococchi sono tra i più resistenti tra i batteri non sporigeni: possono sopravvivere a svariate condizioni ambientali avverse e sono relativamente resistenti al calore, all'essiccamento e ai disinfettanti. Le popolazioni naturali di *Staphylococcus* sono associate soprattutto alla pelle e alle mucose degli animali a sangue caldo e dell'uomo, comunque diffusi in natura, si ritrovano nella polvere dei pavimenti, sui muri e su una grande varietà di oggetti inanimati, nonché nelle acque trattate come anche in quelle marine.

Possono produrre diverse tossine, esoenzimi, enzimi lipolitici e coagulasi. La coagulasi non è un enzima, bensì una proteina extracellulare che si lega alla protrombina dell'ospite per formare un complesso chiamato stafilotrombina. La proteina è il tradizionale marcatore per identificare *S. aureus* in laboratorio. Tuttavia, non ci sono evidenze che essa sia un fattore di virulenza, sebbene sia ragionevole ipotizzare che il batterio possa proteggersi dalle difese dell'ospite provocando un coagulo localizzato. Sono considerati coagulasi positivi *S. aureus*, *S. lugdunensis*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. schleferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. felis*, la specie coagulasi-variabile *S. hyicus* e alcuni ceppi virulenti di *Yersinia*.

Solo *S. aureus* è realmente considerato patogeno e la presenza di altre specie di *Staphylococcus* nelle acque non ha una analoga rilevanza sanitaria. Infatti, se le altre specie hanno una patogenicità limitata, *S. aureus* può invece intervenire nella patologia umana soprattutto come agente eziologico di numerose infezioni della cute e delle mucose determinando, in alcuni casi, anche setticemie e infiammazioni cutanee. Alcuni biotipi appartenenti alla specie sono notoriamente responsabili di gravi infezioni alimentari per la capacità di produrre enterotossine termoresistenti e attive per ingestione.

Il parametro è inserito tra i requisiti microbiologici delle acque di piscina nella tabella A dell'Accordo del 16 gennaio 2003. Ne è prescritta l'assenza obbligatoria in 100 mL nell'acqua di immissione ed è accettato un valore di ≤1 UFC in 100 mL nell'acqua in vasca. Il superamento del valore parametrico costituisce una non conformità al valore stabilito dall'Accordo del 16 gennaio 2003. Tuttavia, è anche da menzionare che l'Organizzazione Mondiale della Sanità, avvertendo che il monitoraggio di routine per questo parametro non è comunque consigliabile, raccomanda, qualora lo si ricerchi, un valore soglia di 100 UFC/100 mL nell'acqua in vasca.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS Pi 004A rev. 00, ISS Pi 004B rev. 00 e ISS Pi 004C rev. 00 vengono utilizzate per la determinazione di *S. aureus* nelle acque di piscina e di ambienti simili e di piscine naturali.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo ISS Pi 004A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Il metodo analitico si basa sulla filtrazione di un volume noto di acqua e sul conteggio delle colonie sviluppate su una membrana posta ad incubare su un idoneo terreno agarizzato. Sono previste prove di conferma.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

2.1.3. Volume da analizzare

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

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Terreno di base *Agar Baird Parker*

Composizione		
Triptone	10	g
Estratto di carne	5	g
Estratto di lievito	1	g
Glicina	12	g
Piruvato di sodio	10	g
Cloruro di litio	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa dissoluzione dei componenti. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per (15±1) minuti. Lasciare raffreddare fino alla temperatura di (50±5)°C prima di aggiungere il supplemento.

2.1.4.2. Emulsione di tuorlo d'uovo al tellurito di potassio al 3,5%

L'emulsione già pronta, è disponibile in commercio. Il tellurito di potassio è classificato come Xi-Irritante. Nella manipolazione seguire le istruzioni della ditta produttrice e adottare precauzioni per la protezione respiratoria, delle mani e della pelle.

2.1.4.3 Terreno completo Agar Baird Parker

Composizione		
Terreno di base (2.1.4.1.)	1000	mL
Emulsione di tuorlo d'uovo (2.1.4.2.)	50	mL

Aggiungere ad 1 L di terreno di base (2.1.4.1.) 50 mL di emulsione di tuorlo d'uovo al tellurito di potassio (2.1.4.2.). Agitare per ottenere una soluzione omogenea e distribuire,

rispettando le comuni regole di asepsi, in capsule di Petri. Il terreno, pronto per l'uso, può essere conservato a (5±3)°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

2.1.4.4. Brodo Nutritivo

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

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata, seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Distribuire in tubi in ragione di circa di 10 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per (15±1) minuti.

Il terreno pronto per l'uso può essere conservato a (5±3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali. Il substrato può essere sostituito da 2.1.4.5.

2.1.4.5. Infuso di Cuore e Cervello

Composizione		
Infuso di cervello di vitello	200	g
Infuso di cuore di bue	250	g
Peptocomplex	10	g
Glucosio	2	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio fosfato bibasico	2,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Distribuire in tubi in ragione di circa di 10 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per (15±1) minuti.

Il terreno preparato, pronto per l'uso, può essere conservato al buio ad una temperatura inferiore a (20±1)°C.

Il substrato può essere utilizzato in alternativa al Brodo Nutritivo (2.1.4.4).

2.1.4.6. Agar Nutritivo

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

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa dissoluzione degli ingredienti. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per (15±1) minuti. Raffreddare fino alla temperatura di (50±5)°C e distribuire in capsule di Petri.

Il terreno pronto per l'uso può essere conservato a (5±3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

2.1.4.7. Acqua ossigenata al 3%

La soluzione, necessaria per la prova della catalasi, è disponibile in commercio alla concentrazione indicata e pronta per l'uso. Conservare al riparo dalla luce diretta alla temperatura di (5±3)°C. La scadenza è riportata sulla confezione.

2.1.4.8. Plasma EDTA o Plasma citrato per la coagulasi

Il plasma di coniglio, necessario per l'individuazione di *S. aureus* coagulasi positivo, si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il contenuto del flacone con acqua distillata sterile, seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Il plasma ricostituito può essere conservato a (5±3)°C per 15 giorni e fino a 30 giorni a temperatura intorno a (–20±1)°C. Ogni partita di plasma va saggiata con un ceppo di controllo coagulasi positivo (*S. aureus* ATCC 27217) e un ceppo di controllo coagulasi negativo (*S. simulans* ATCC 11631). In alternativa ai materiali di riferimento indicati, utilizzare comunque colture standard certificate.

È possibile anche servirsi dei test di agglutinazione al lattice disponibili in commercio.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Filtrazione e incubazione

Filtrare 100 mL di campione attraverso una membrana sterile di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominali di 45 µm (oppure pori asimmetrici 0,7/0,2 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, seguendo scrupolosamente le norme di asepsi. Trasferire la membrana sul substrato di isolamento Agar Baird Parker (2.1.4.3.). Incubare a (36±1)°C per (24 + 24) ore.

2.1.5.2. Identificazione e conteggio delle colonie

I microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* coagulasi positivi producono sul substrato di isolamento colonie nere per effetto della riduzione del tellurito a tellurio metallico. Dopo 24 ore di sviluppo le colonie, che appaiono brillanti, lisce e convesse con margini netti, circondate in genere da un alone chiaro dovuto all'attività lecitinasica si presentano con un diametro di (1÷1,5) mm; dopo 48 ore di incubazione hanno comunemente un diametro di (1,5÷2,5) mm. Le specie appartenenti al genere *Staphylococcus* coagulasi negative sviluppano, invece, colonie nere con margini irregolari, non circondate da alone trasparente. Nella Tabella 1 sono riportate le caratteristiche di crescita di colonie dei batteri bersaglio e di altri batteri.

Tabella 1. Caratteristiche delle colonie che crescono sul terreno Baird Parker

Organismo	Crescita su Baird Parker	Tipi di colonie
S. aureus	Buona	Lucide, grigio-nere, convesse di 1-1,5 mm di diametro (dopo 18 ore), fino a 3 mm (a 48 ore), margini chiari interi circondati da aloni di chiarificazione di 2-5 mm (verificare per alone)
S. epidermidis	Variabile	Nere non lucide e raramente con alone
S. saprophyticus	Variabile	Irregolari e possono produrre chiarificazione. Possono essere prodotte anche ampie zone opache dopo 24 ore
Micrococcus spp	Variabile	Molto piccole. Marroni o nere senza chiarificazione
Bacillus spp	Variabile	Marrone scuro opache con occasionali zone di chiarificazione dopo 48 ore
Escherichia coli	Variabile	Marrone-nere grandi
Proteus spp	Variabile	Marrone-nere senza zone di chiarificazione
Lieviti	Variabile	Bianche senza zone di chiarificazione

Per verificare la presenza di *S. aureus* è opportuno sottoporre a prove di conferma le colonie nere con alone (eventualmente senza alone). È possibile procedere, in alternativa, all'identificazione con i kit miniaturizzati disponibili in commercio.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *S. aureus* ATCC 6538 o *S. aureus* ATCC 25923 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.5.3. Conferma

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie alla specie *S. aureus* è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma:

- prova della catalasi;
- prova della coagulasi.

Prima di effettuare ciascuna prova, è necessario prelevare con un'ansa sterile le colonie sospette sviluppate sul substrato di isolamento (2.1.4.3.) isolandole su Agar Nutritivo (2.1.4.6.). Incubare a (36±1)°C per (22÷26) ore. Eseguire tutte le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.1.5.4.Prova della presenza dell'enzima catalasi

La prova differenzia i microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* da quelli appartenenti al genere *Streptococcus*. Stemperare su un vetrino portaoggetti una colonia cresciuta su Agar Nutritivo (2.1.4.6.) e ricoprirla con alcune gocce di acqua ossigenata al 3% (2.1.4.7.).

La presenza dell'enzima catalasi è rilevata dallo sviluppo immediato di bollicine di gas.

I microrganismi del genere *Staphylococcus* sono catalasi positivi.

2.1.5.5.Prova della presenza della coagulasi

La prova evidenzia l'attività coagulante esercitata dagli stafilococchi potenzialmente patogeni sul plasma. Tale attività è dovuta ad almeno due fattori: coagulasi libera (enzima extracellulare) e coagulasi legata o clumping factor (antigene della parete cellulare).

La coagulasi è presente nella maggior parte dei biotipi, appartenenti alla specie *S. aureus* e in biotipi appartenenti alle specie *S. intermedius* e *S. hyicus*, opportunisti patogeni per gli animali, in *S. lugdunensis*, *S. pseudintermedius*, *S. schleferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. felis.* È sempre assente nelle specie saprofite e commensali.

In alternativa alla prova sotto descritta, il test può essere eseguito trasferendo la membrana dal substrato di isolamento Agar Baird Parker (2.1.4.3.) al terreno Agar Baird Parker (RPF) (2.3.4.5). Incubare per (21±3) ore fino a 48 ore a (36±1)°C. Alzare la membrana senza rimuoverla e verificare la presenza di aloni di precipitazione che comunque possono occasionalmente svanire a 48 ore. Il test è da considerarsi positivo se sono presenti aloni in corrispondenza delle colonie presenti sulla membrana.

2.1.5.6.Prova in provetta per la ricerca della coagulasi libera

Prelevare con un'ansa sterile una colonia cresciuta su Agar Nutritivo (2.1.4.6.), stemperarla in Brodo Nutritivo (2.1.4.4.) o in Infuso di Cuore e Cervello (2.1.4.5.). Incubare a (36±1)°C per (22÷26) ore.

Dosare in una provetta sterile 0,5 mL di plasma EDTA o plasma citrato (2.1.4.8.) e 0,5 mL della brodocoltura sviluppatasi in Brodo Nutritivo o in Infuso di Cuore e Cervello, utilizzando pipette sterili. In alternativa, emulsionare 2-4 colonie, cresciute su Agar Nutritivo (2.1.4.6.), nella provetta contenente il plasma EDTA o citrato; miscelare delicatamente e incubare a (36±1)°C, preferibilmente in bagno termostatato. Durante le prime 4 ore di incubazione, effettuare la lettura ogni ora, inclinando la provetta da un lato con cura e senza agitare. Nei due

terzi o in tutto il mezzo colturale la presenza dell'enzima coagulasi è rivelata da un coagulo ben gelificato. Se la prova risulta negativa, incubare ancora la provetta e ripetere la lettura dopo altre (22÷26) ore.

Il test in provetta accerta sia la coagulasi libera sia la coagulasi legata.

2.1.5.7.Prova per la ricerca della coagulasi legata

Prelevare con un'ansa sterile una colonia cresciuta su Agar Nutritivo (2.1.4.6.), stemperarla in una goccia d'acqua su un vetrino portaoggetti. Miscelare la sospensione ottenuta con un'ansata di plasma EDTA o plasma citrato (2.1.4.8.). Gli Stafilococchi positivi alla coagulasi legata producono ammassi macroscopici entro (5÷15) secondi. Se un biotipo è positivo alla coagulasi legata è sicuramente positivo anche alla coagulasi libera, se è negativo alla coagulasi legata può essere sia negativo che positivo alla coagulasi libera; pertanto è necessario confermare la prova su vetrino con quella in provetta.

Il test è indicato come tecnica di screening in presenza di numerosi campioni.

2.1.6. Espressione dei risultati

Qualora si sia proceduto allo svolgimento delle prove di conferma, il numero di *S. aureus* si calcola in base al numero di colonie contate e già sottoposte a conferma, riportando il valore riferito a 100 mL di campione.

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

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

dove:

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

2.2. Metodo ISS Pi 004B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Il metodo analitico si basa sulla filtrazione di un volume noto di acqua e sul conteggio delle colonie sviluppate sulla membrana posta ad incubare su un idoneo terreno agarizzato. Sono previste prove di conferma.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

2.2.3. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, è generalmente pari a 100 mL di acqua.

2.2.4. Terreni di coltura e reagenti

2.2.4.1. Substrato di isolamento Agar Sale Mannite

Composizione		
Estratto di carne	1	g
Peptocomplex	10	g
Mannitolo	10	g
Sodio cloruro	75	g
Rosso fenolo	0,025	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa dissoluzione dei componenti. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per (15±1) minuti. Raffreddare fino alla temperatura di (50±5)°C e distribuire in capsule di Petri.

Il terreno pronto per l'uso può essere conservato a (5±3)°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

2.2.4.2. Brodo Nutritivo

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

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Distribuire in tubi in ragione di circa di 10 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per (15±1) minuti.

Il terreno pronto per l'uso può essere conservato a (5±3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali. Il substrato può essere sostituito da 2.2.4.3.

2.2.4.3. Infuso di Cuore e Cervello

Composizione		
Infuso di cervello di vitello	200	g
Infuso di cuore di bue	250	g
Peptocomplex	10	g
Glucosio	2	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio fosfato bibasico	2,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Distribuire in tubi in ragione di circa di 10 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per (15±1) minuti.

Il terreno preparato, pronto per l'uso, può essere conservato al buio ad una temperatura inferiore a 20°C.

Il substrato può essere utilizzato in alternativa al Brodo Nutritivo (2.2.4.2.).

2.2.4.4. Agar Nutritivo

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

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa dissoluzione dei componenti. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per (15±1) minuti. Raffreddare fino alla temperatura di circa (50±5)°C e distribuire in capsule di Petri.

Il terreno pronto per l'uso può essere conservato a (5±3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

2.2.4.5. Acqua Ossigenata al 3%

La soluzione, necessaria per la prova della catalasi, è disponibile in commercio alla concentrazione indicata e pronta per l'uso. Conservare al riparo dalla luce diretta alla temperatura di (5±3)°C. La scadenza è riportata sulla confezione.

2.2.4.6. Plasma EDTA o plasma citrato

Il plasma di coniglio, necessario per l'individuazione di *S. aureus* coagulasi positivo, si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il contenuto del flacone con acqua distillata sterile, seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Il plasma ricostituito può essere conservato a (5±3)°C per 15 giorni e fino a 30 giorni a temperatura intorno a (–20±1)°C. Ogni partita di plasma va saggiata con un ceppo di controllo coagulasi positivo (*S. aureus* ATCC 27217) e un ceppo di controllo coagulasi negativo (*S. simulans* ATCC 11631). In alternativa ai materiali di riferimento indicati, utilizzare comunque colture standard certificate.

È possibile anche servirsi dei test di agglutinazione al lattice disponibili in commercio, che possono sostituire i test per la prova della coagulasi.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Filtrazione e incubazione

Filtrare 100 mL di campione attraverso una membrana sterile di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45 μm (pori simmetrici da 0,45 μm oppure pori asimmetrici 0,7/0,2 μm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, seguendo scrupolosamente le norme di asepsi. Trasferire la membrana sul substrato di isolamento Agar Sale Mannite (2.2.4.1.). Incubare a (36±1)°C per (33÷37) ore.

2.2.5.2. Identificazione e conteggio delle colonie

I microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* coagulasi-positivi producono su Agar Sale Mannite (2.2.4.1.) larghe colonie gialle circondate da un alone giallo. La produzione di acido, dovuta alla fermentazione del mannitolo, provoca l'abbassamento del pH e il viraggio dell'indicatore del terreno (rosso fenolo) dal rosso al giallo.

Le specie appartenenti al genere *Staphylococcus* coagulasi negative sviluppano invece, colonie piccole di colore rosso porpora.

Per verificare la presenza di *S. aureus* è opportuno sottoporre a prove di conferma le colonie sospette. In alternativa, è possibile procedere all'identificazione con le prove biochimiche anche utilizzando i kit miniaturizzati disponibili in commercio.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *S. aureus* ATCC 25923 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

2.2.5.3. Conferma

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie alla specie *S. aureus* è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma:

- prova della catalasi;
- prova della coagulasi.

Prima di effettuare ciascuna prova, è necessario prelevare con un'ansa sterile le colonie sospette sviluppate sul substrato di isolamento (2.2.4.1.) isolandole su Agar Nutritivo (2.2.4.4.). Incubare a (36±1)°C per (22÷26) ore. Eseguire tutte le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.2.5.4. Prova della presenza dell'enzima catalasi

La prova differenzia i microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* da quelli appartenenti al genere *Streptococcus*. Stemperare su un vetrino portaoggetti una colonia cresciuta su Agar Nutritivo (2.2.4.4.) e ricoprirla con alcune gocce di acqua ossigenata al 3% (2.2.4.5.).

La presenza dell'enzima catalasi è rilevata dallo sviluppo immediato di bollicine di gas.

I microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* sono catalasi positivi.

2.2.5.5. Prova della presenza della coagulasi

La prova evidenzia l'attività coagulante esercitata dagli stafilococchi potenzialmente patogeni sul plasma. Tale attività è dovuta ad almeno due fattori: coagulasi libera (enzima extracellulare) e coagulasi legata o clumping factor (antigene della parete cellulare).

La coagulasi è presente nella maggior parte dei biotipi, appartenenti alla specie *S. aureus* e in biotipi appartenenti alle specie *S. intermedius* e *S. hyicus*, opportunisti patogeni per gli animali, in *S. lugdunensis*, *S. pseudintermedius*, *S. schleferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini*, *S. felis.* È sempre assente nelle specie saprofite e commensali.

In alternativa alla prova sotto descritta, il test può essere eseguito trasferendo la membrana dal substrato di isolamento Agar Sale Mannite (2.2.4.1) al terreno Agar Baird Parker (RPF) (2.3.4.5). Incubare per (21± 3) ore fino a 48 ore a (36±1)°C. Alzare la membrana senza rimuoverla e verificare la presenza di aloni di precipitazione che comunque possono occasionalmente svanire a 48 ore. Il test è da considerarsi positivo se sono presenti aloni in corrispondenza delle colonie presenti sulla membrana.

2.2.5.6. Prova in provetta per la ricerca della coagulasi libera

Prelevare con un'ansa sterile una colonia cresciuta su Agar Nutritivo (2.2.4.4.), stemperarla in Brodo Nutritivo (2.2.4.2.) o in Infuso di Cuore e Cervello (2.2.4.3.). Incubare a (36±1)°C per (22÷26) ore.

Dosare in una provetta sterile 0,5 mL di plasma EDTA o plasma citrato (2.1.4.8.) e 0,5 mL della brodocoltura sviluppatasi in Brodo Nutritivo o in Infuso Cuore Cervello, utilizzando pipette sterili.

In alternativa, emulsionare 2-4 colonie, cresciute su Agar Nutritivo (2.2.4.4.), nella provetta contenente il plasma EDTA o citrato; miscelare delicatamente e incubare a (36±1)°C, preferibilmente in bagno termostatato. Durante le prime 4 ore d'incubazione, effettuare la lettura ogni ora, inclinando la provetta da un lato con cura e senza agitare. Nei due terzi o in tutto il mezzo colturale la presenza dell'enzima coagulasi è rivelata da un coagulo ben gelificato. Se la prova risulta negativa, incubare ancora la provetta e ripetere la lettura dopo altre (22÷26) ore.

Il test in provetta accerta sia la coagulasi libera sia la coagulasi legata.

2.2.5.7. Prova per la ricerca della coagulasi legata

Prelevare con un'ansa sterile una colonia cresciuta su Agar Nutritivo (2.2.4.4.), stemperarla in una goccia d'acqua su un vetrino portaoggetti. Miscelare la sospensione ottenuta con un'ansata di plasma EDTA o plasma citrato (2.2.4.6.). Gli Stafilococchi positivi alla coagulasi legata producono ammassi macroscopici entro (5÷15) secondi. Se un biotipo è positivo alla coagulasi legata è sicuramente positivo anche alla coagulasi libera, se è negativo alla coagulasi legata può essere sia negativo che positivo alla coagulasi libera; pertanto è necessario confermare la prova su vetrino con quella in provetta.

Il test è indicato come tecnica di screening in presenza di numerosi campioni.

2.2.6. Espressione dei risultati

Qualora si sia proceduto allo svolgimento delle prove di conferma, il numero di *S. aureus* si calcola in base al numero di colonie contate e già sottoposte a conferma, riportando il valore riferito a 100 mL di campione.

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

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

dove

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

2.3. Metodo ISS Pi 004C rev. 00

2.3.1. Principio del metodo

Il metodo analitico si basa sulla filtrazione di un volume noto di acqua e sul conteggio diretto degli stafilococchi coagulasi-positivi cresciuti, dopo un'incubazione in aerobiosi a 37°C su un terreno selettivo agarizzato al plasma di coniglio e fibrinogeno. Dato che il terreno agarizzato al plasma di coniglio e al fibrinogeno si basa sulla reazione alla coagulasi, non è necessario procedere a prove di conferma.

Il metodo fa riferimento alla norma XP T 90-412.

2.3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

2.3.3. Volume da analizzare

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

2.3.4. Terreni di coltura e reagenti

2.3.4.1. Terreno di base Agar Baird Parker

Composizione		
Triptone	10	g
Estratto di carne	5	g
Estratto di lievito	1	g
Glicina	12	g
Piruvato di sodio	10	g
Cloruro di litio	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il terreno in acqua distillata seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa dissoluzione dei componenti. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per (15±1) minuti.

2.3.4.2. Soluzione di tellurito di potassio

Composizione		
Tellurito di potassio	1	g
Acqua distillata sterile	100	mL

L'emulsione già pronta, è disponibile in commercio.

Sciogliere il tellurito di potassio in acqua, evitare il surriscaldamento. La polvere si dovrebbe sciogliere rapidamente. Sterilizzare per filtrazione attraverso membrane aventi porosità di 0,22 micron. La soluzione può essere conservata fino a 1 mese a (5±3)°C. Rimuovere la soluzione se si forma un precipitato bianco durante la conservazione.

Il tellurito di potassio è classificato come Xi-Irritante. Nella manipolazione seguire le istruzioni della ditta produttrice e adottare precauzioni per la protezione respiratoria, delle mani e della pelle.

2.3.4.3. Soluzione di fibrinogeno bovino

Composizione		
Fibrinogeno bovino	5-7	g
Acqua distillata sterile	100	mL

Il supplemento è reperibile in commercio.

In condizioni asettiche, sciogliere il fibrinogeno bovino in acqua immediatamente prima dell'uso eseguendo la pesata in funzione della purezza del fibrinogeno.

2.3.4.4. Soluzione di plasma di coniglio ed inibitore della tripsina

Composizione		
Plasma di coniglio con EDTA per la coagulasi (plasma EDTA-coagulasi)	30	mL
Inibitore della tripsina	100	mg

Il supplemento è reperibile in commercio.

Operando in condizioni asettiche, sciogliere i componenti in acqua immediatamente prima dell'uso.

2.3.4.5. Terreno completo Agar Baird Parker (RPF)

Composizione		
Terreno di base	900	mL
Soluzione di tellurito di potassio	2,5	mL
Soluzione di fibrinogeno bovino	75	mL
Soluzione di plasma di coniglio ed inibitore della tripsina	25	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno completo è reperibile anche in commercio in piastre già pronte per l'uso.

Eventualmente, fondere il terreno base, quindi raffreddarlo fino a (48±1)°C a bagnomaria. In condizioni asettiche, aggiungere le tre soluzioni preventivamente riscaldate a bagnomaria a (48±1)°C. Miscelare bene con movimento rotatorio dopo ogni aggiunta onde limitare la formazione di schiuma. Non superare i 48° C per evitare la denaturazione irreversibile del fibrinogeno. Utilizzare il terreno completo immediatamente dopo la sua preparazione onde evitare l'eventuale precipitazione del plasma. Quando preparate in laboratorio, le piastre possono essere conservate al massimo per 24 ore a (5±3)°C.

Se viene utilizzata una soluzione di fibrinogeno bovino/plasma di coniglio disponibile in commercio, seguire con estrema cura le istruzioni del produttore per la preparazione della soluzione e del terreno completo (con particolare riferimento alla temperatura del terreno base), altrimenti il terreno potrebbe perdere completamente la propria attività.

Saggiare il terreno con un ceppo di controllo coagulasi positivo (*S. aureus* ATCC 27217) e un ceppo di controllo coagulasi negativo (*S. simulans* ATCC 11631). In alternativa ai materiali di riferimento indicati, utilizzare comunque colture certificate.

2.3.5. Procedura

2.3.5.1. Filtrazione e incubazione

Filtrare 100 mL di campione attraverso una membrana sterile di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominali di 45 µm (oppure pori asimmetrici 0,7/0,2 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, seguendo scrupolosamente le norme di asepsi. Trasferire la membrana sul substrato di isolamento Agar Baird Parker (RPF) (2.3.4.5.). Incubare a (36±1)°C per (44±4) ore.

2.3.5.2. Identificazione e conteggio delle colonie

Eseguire una prima lettura a 21±3 ore. Verificare la presenza delle caratteristiche zone opache prima di continuare l'incubazione. Infatti, gli aloni di precipitazione possono occasionalmente svanire già a 48 ore.

L'alone opaco sarà visibile sotto la membrana; pertanto, sollevare delicatamente la membrana senza rimuoverla.

Gli stafilococchi formano colonie nere o grigie, o addirittura bianche, essendo minore la concentrazione di tellurito, anche di piccole dimensioni, circondate da un alone opaco di precipitazione della fibrina indicante l'attività della coagulasi. Le colonie di *Proteus* possono mostrare, all'inizio dell'incubazione, un aspetto simile a quello delle colonie di stafilococchi coagulasi-positivi. Comunque, trascorso un periodo di incubazione compreso tra 24 ore e 48 ore, esse acquistano l'aspetto di una coltura diffusa, di colore più o meno tendente al marrone, che ne consente la differenziazione dagli stafilococchi.

Sottoporre le colonie coagulasi-positive alla colorazione di Gram per verificare la presenza di cocchi Gram positivi.

Sono da considerare stafilococchi patogeni (*S. aureus*) confermati le colonie coagulasi-positive e risultate essere cocchi Gram positivi.

Contare le colonie tipiche presenti su ogni piastra.

2.3.6. Espressione dei risultati

Il numero di stafilococchi coagulasi-positivi si calcola in base al numero di colonie confermate contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

Bibliografia di riferimento

Brooks GF, Carroll K, Butel JS, MorseSA, Mietzner TA.(Ed.). *Medical Microbiology* 26th ed. London: Mcgraw-Hill Publ. Comp; 2012.

De Buyser ML, Audinet N, Delbart MO, Maire M, Françoise F. Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive staphylococci in cheeses made from raw milk. *Food Microbiology* 1998;15:339-346.

Italia. 16 gennaio 2003. Accordo tra il Ministero della Salute, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano sugli aspetti igienico-sanitari per la costruzione, la manutenzione e la vigilanza delle piscine ad uso natatorio. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 51, 3 marzo 2003.

Sneath PHA (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 2.* Baltimore: William and Wilkins Co.; 1996.

XP T 90-412. *Qualité de l'eau Recherche et Dénombrement des staphylocoques pathogènes. Méthode par filtration sur membrane*. La Plaine Saint-Denis: Association Française de Normalisation (AFNOR); 2006.

CONTA BATTERICA 22°C E 36°C

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al paramento Conta batterica a 22°C e 36°C rilevato con il metodo ISS Pi 005 rev. 00.

È un parametro che permette di rilevare un gruppo eterogeneo di microrganismi aerobi che hanno differenti capacità metaboliche e richieste nutrizionali. L'uso di temperature diverse permette di mettere in evidenza microrganismi mesofili (a 36°C) e psicrofili (a 22°C). Molti di essi possono appartenere alla microflora ambientale autoctona delle acque, presente naturalmente nell'ambiente.

Il parametro, così come viene rilevato, non ha rilevanza sanitaria, sebbene tra gli isolati è possibile spesso identificare batteri opportunisti patogeni, quali *Pseudomonas*, *Serratia, Aeromonas, Acinetobacter, Legionella, Mycobacterium, Klebsiella.*

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

Il parametro Conta batterica a 22°C e 36°C è inserito tra i requisiti microbiologici delle acque di piscina nella tabella A dell'Accordo del 16 gennaio 2003. Per la conta a 22°C è prescritto un valore di ≤100 UFC in 1 mL per l'acqua di immissione e un valore di ≤200 UFC in 1 mL per l'acqua in vasca; mentre per la conta a 36°C il limite è di ≤10 UFC in 1 mL per l'acqua di immissione e di ≤100 UFC in 1 mL per l'acqua in vasca.

Il superamento del valore parametrico costituisce una non conformità al valore stabilito dall'Accordo del 16 gennaio 2003. Tuttavia, il parametro, più che una rilevanza sanitaria, riveste il ruolo di indicatore di qualità microbiologica in generale ed è un segnale che fornisce indicazioni sull'efficacia dei trattamenti subiti dall'acqua.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica ISS Pi 005 rev. 00 viene utilizzata per la determinazione di microrganismi aerobi coltivabili a 22°C e a 36°C (Conta batterica) nelle acque di piscina e di ambienti simili e nelle acque di piscine naturali e termali.

2. Principio del metodo

La procedura analitica permette di contare le colonie di tutti i microrganismi (batteri, lieviti e funghi) cresciuti nella compagine del terreno agarizzato (tecnica dell'inclusione in agar) analizzando aliquote note di campione miscelate con il substrato mantenuto fuso e lasciato successivamente solidificare in capsule di Petri.

Il metodo è in linea con la norma UNI EN ISO 6222.

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

4. Terreni di coltura e reagenti

4.1 Substrato di isolamento

4.1.1 Agar all'estratto di lievito

Composizione		
Estratto di lievito	3	g
Triptone	6	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino a ebollizione agitando frequentemente. Distribuire in tubi in ragione di circa 15 mL/tubo e sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per 15 minuti. Conservare a (5±3)°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

5. Procedura

5.1 Volume da analizzare

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

5.2 Semina del campione e incubazione

La procedura di analisi per l'enumerazione dei microrganismi a 36°C e a 22°C è la stessa per entrambi i parametri e prevede l'uso della tecnica dell'inclusione in agar.

Seminare sul fondo di capsule Petri vuote 1 mL di campione, e comunque aliquote non superiori a 2 mL, o di una sua diluizione. Versare, nelle capsule contenenti l'inoculo, circa 15 mL di substrato di isolamento (4.1.1) mantenuto fuso alla temperatura di (45±1)°C rispettando le comuni regole di asepsi. Non superare i 15 minuti di intervallo tra il momento dell'inoculo in capsula e l'aggiunta del terreno colturale. Non mantenere il terreno in fusione in bagnomaria oltre le 4 ore.

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

5.3 Conteggio ed interpretazione dei risultati

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

6. Espressione dei risultati

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

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

Bibliografia di riferimento

Allen M, Edberg S and Reasoner D. Heterotrophic plate count (HPC) bacteria – What is their significance in drinking water? In: *Proceedings of the NFS International/WHO Symposium on Bacteria in drinking water. Public health implications?* Geneva 24-27 aprile 2002. Geneva: World Health Organization; 2003. p. 34-41.

Italia. 16 gennaio 2003. Accordo tra il Ministero della Salute, le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano sugli aspetti igienico-sanitari per la costruzione, la manutenzione e la vigilanza delle piscine ad uso natatorio. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 51, 3 marzo 2003.

UNI EN ISO 6222. *Qualità dell'acqua - Valutazione quantitativa dei microrganismi vitali. Conteggio delle colonie per inoculo su terreno agarizzato*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2001.

DETERMINAZIONE DEI BATTERI COLIFORMI

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Coliformi rilevato con i metodi ISS Pi 006A rev. 00; ISS Pi 006B rev. 00.

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

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

L'appartenenza al gruppo dei coliformi, più che sulle caratteristiche sistematiche dei diversi microrganismi, si è basata storicamente sul metodo utilizzato per il loro rilevamento che sfrutta la loro capacità di fermentare il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di (35÷37)°C in 48 ore. Tuttavia, negli ultimi anni si è andata confermando la nozione che dei coliformi presenti nelle acque, una percentuale relativamente elevata non sia in grado né di fermentare il lattosio, né di produrre gas nei tradizionali terreni di coltura e, soprattutto, che i test più classici, come l'IMVIC (Indolo, Rosso Metile, Voges Proskauer, Citrato), non hanno nessun valore discriminante per l'identificazione di *Klebsiella pneumoniae*, di *Enterobacter cloacae* oltre che delle molte specie ambientali. Diversamente, si è consolidata l'evidenza che un'alta percentuale, intorno al 99%, possieda l'enzima β-D-galattosidasi.

Negli ultimi anni, sulla base di questo principio, sono stati quindi elaborati nuovi metodi che possono rappresentare un'alternativa interessante in rapporto alle tecniche colturali classiche. Utilizzano, infatti, substrati diversi da quelli tradizionali, modificati con l'aggiunta di composti cromogeni e fluorogeni, e che si basano sullo sfruttamento di questa specifica attività enzimatica. In Tabella 1 sono elencati i generi di coliformi classificabili e rilevabili con i metodi normalizzati che si sono susseguiti.

Tabella 1. Classificazione dei coliformi definita in base al tipo di metodo usato per il loro rilevamento

Metodo analitico	Generi compresi nel gruppo dei coliformi
ISO 9308-1: 1990	*Escherichia, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter*
UNI EN ISO 9308-1: 2002	*Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Yersinia, Serratia, Hafnia, Pantoea, Kluyvera*
Metodo ISO 9308-2: 2012	*Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Yersinia, Serratia, Hafnia, Pantoea, Kluyvera, Cedecea, Ewingella, Moellerella, Leclercia, Rahnella, Yokenella*

Anche se l'Accordo tra il Ministero della Salute, le Regioni e le Province Autonome di Trento e di Bolzano relativo agli aspetti igienico-sanitari per la costruzione, la manutenzione e

la vigilanza delle piscine a uso natatorio del 16 gennaio 2003 non prevede la ricerca dei coliformi nelle acque di piscina, di seguito vengono riportate le procedure per la loro determinazione che potrebbe risultare utile per la verifica dell'efficienza dei trattamenti che subisce l'acqua in questi impianti.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS Pi 006A rev. 00 e ISS Pi 006B rev. 00 vengono utilizzate per la determinazione dei batteri coliformi a 37°C nelle acque di piscina e di ambienti simili, così come nelle acque delle piscine naturali.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo ISS Pi 006A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Metodo miniaturizzato MPN a multi-pozzetto. Il metodo consente di determinare la concentrazione di batteri coliformi a 37°C in un determinato volume di acqua. È applicabile all'analisi di acque anche disinfettate contenenti coliformi danneggiati.

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

Il metodo è in linea con la norma ISO 9308-2.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

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

- buste a pozzetto Quanti-Tray™;
- comparatore di riferimento Quanti-Tray™;
- flaconi di plastica con antischiuma (100 mL) oppure flaconi in vetro con chiusura a vite di Schott sterilizzabili in autoclave, sterili;
- termosigillatrice automatica Quanti-Tray™.

2.1.3. Volume da analizzare

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

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Colilert Quanti-Tray™

Composizione 1		
Alanina	da 0,025 a 0,08	g/L
Arginina	da 0,030 a 0,08	g/L
Acido aspartico	da 0,056 a 0,085	g/L
Cistina	da 0,002 a 0,005	g/L
Acido glutammico	da 0,102 a 0,207	g/L
Glicina	da 0,015 a 0,15	g/L
Istidina	da 0,005 a 0,020	g/L
Isoleucina	da 0,0145 a 0,046	g/L
Leucina	da 0,030 a 0,079	g/L
Lisina	da 0,034 a 0,068	g/L
Metionina	da 0,011 a 0,023	g/L
Fenilalanina	da 0,018 a 0,037	g/L
Prolina	da 0,088 a 0,093	g/L
Serina	da 0,028 a 0,044	g/L
Treonina	da 0,018 a 0,032	g/L
Triptofano	da 0,0036 a 0,005	g/L
Tirosina	da 0,0064 a 0,018	g/L
Valina	da 0,023 a 0,056	g/L
Cobalto	tracce	g/L
Rame	tracce	g/L
Ferro	0,00165	g/L
Piombo	tracce	g/L
Biotina	da 0,00005 a 0,00016	g/L
Colina	da 0,050 a 0,10	g/L
Cianocobalamina	tracce	g/L
Acido folico	da 0,000075 a 0,0014	g/L
Inositolo	da 0,060 a 0,12	g/L
Niacina	da 0,00385 a 0,0070	g/L
Acido nicotinico	da 0,014 a 0,03	g/L
PABA	da 0,020 a 0,038	g/L
Acido pantotenico	da 0,01 a 0,013	g/L
Piridossina	da 0,0015 a 0,0021	g/L
Riboflavina	da 0,0028 a 0,0058	g/L
Tiamina	da 0,0037 a 0,026	g/L
Timidina	da 0,010 a 0,02	g/L
Induttori enzimatici	0,015	g/L

Composizione 2		
Ammonio solfato (anidro)	5,000	g/L
HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico) (senza acido)	6,864	g/L
HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico) (sale di sodio)	5,292	g/L
Acido D-gluconico (sale di calcio)	0,145	g/L
Sodio solfito (anidro)	0,040	g/L
Amfotericina B (solubilizzata) [a]	0,001	g/L
Magnesio solfato (anidro)	0,100	g/L
O-nitrofenil-β-D-galattopiranoside	0,500	g/L
4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide	0,075	g/L
Zinco solfato (eptaidrato)	0,0005	g/L
Manganese solfato	0,0005	g/L
Acido piruvico (sale di sodio)	0,005	g/L
Cloruro di sodio	0,100	g/L
Precursori del DNA	0,005	g/L
Vancomicina	0,005	g/L
Cefsulodina	0,011	g/L
Precursori degli aminoacidi	0,001	g/L
Fonti di fosfato	0,1	g/L

[a] Concentrazione finale dell' Amfotericina B dopo aver tenuto conto della concentrazione della soluzione. Le quantità degli elementi in traccia sono discrezionali e includono quantità inferiori a 0,001 g/L. Anche le quantità delle vitamine in traccia sono discrezionali e includono quantità inferiori a 0,5 µg/g.

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

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

Il prodotto è certificato come non tossico.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Miscelazione del campione

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

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

2.1.6. Interpretazione dei risultati

Dopo incubazione, contare il numero di pozzetti gialli, eventualmente confrontando il colore rispetto ad un comparatore, e calcolare il valore MPN facendo riferimento alla relativa Tabella in Appendice B.

Risultati positivi ottenuti prima delle 18 ore di incubazione, come anche risultati negativi osservati dopo le 22 ore, sono da considerarsi validi. Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 31488 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 o 27853; in alternativa, comunque utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.7. Espressione dei risultati

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

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

È da considerare che, qualora si ottenga un valore non intero si ritiene comunque indispensabile approssimare all'unità il risultato, per difetto quando il valore della parte decimale sia < 0,5, altrimenti per eccesso.

2.1.8. Prestazioni del metodo

Sono disponibili dati di validazione del metodo ottenuti in base alle norme specifiche e dati di equivalenza in base alla norma UNI EN ISO 17994.

2.2. Metodo ISS Pi 006B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri coliformi che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione alla temperatura di (36±1)°C per (20±4) ore, contare le colonie tipiche (coliformi presuntivi) e sottoporle a conferma per la verifica dell'appartenenza al gruppo dei coliformi.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

2.2.3. Volume da analizzare

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

2.2.4. Terreni di coltura e reagenti

2.2.4.1. M-Endo Agar LES

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

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

Il terreno è classificato come Xn - Nocivo. La scheda di sicurezza, a cui è necessario fare riferimento, informa che la fucsina basica (Magenta I) ha una tossicità acuta pari a LD_{50} orale topo 5000 mg/kg ed è un possibile cancerogeno secondo IARC, OSHA, ACGIH, NTP ed EPA.

In caso di malessere o di incidente, consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta). Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria (mascherina, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi), protezione degli occhi (occhiali protettivi).

2.2.4.2. Agar soia triptone

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

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

2.2.4.3. Brodo lattosato al bromocresolo

Composizione		
Peptone	5	g
Lattosio	5	g
Estratto di carne	2	g
Porpora di bromocresolo	0,025	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, distribuire in tubi e sterilizzare a (115±3)°C per 20 minuti. Conservare a (5±3)°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

2.2.4.4. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Composizione		
N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto, come diammina aromatica, viene classificato come sostanza tossica e nociva.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Filtrazione

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45 µm (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici da 0,7/0,2 µm). Porre la membrana sulla superficie del terreno M-Endo Agar LES (2.2.4.1.) e procedere all'incubazione a (36±1)°C per (18÷24) ore.

2.2.5.2. Lettura dei risultati

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

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

2.2.5.3. Prove di conferma

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

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

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

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

2.2.5.4. Prova della citocromossidasi

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

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

2.2.5.5. Prova della fermentazione del lattosio

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

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia sospetta subcoltivata sul terreno Agar soia triptone (2.2.4.2.) e inoculare in un tubo del Brodo lattosato al bromocresolo (2.2.4.3.). Incubare a (36±1)°C per (24÷48) ore.

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

2.2.6. Interpretazione dei risultati

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

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

2.2.7. Espressione dei risultati

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

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

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

dove:

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

Bibliografia di riferimento

American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed.* Washington, DC: APHA; 2012.

APAT/IRSA-CNR. *Metodi Analitici per le Acque*. *29/2003*. Roma: APAT/IRSA-CNR; 2003.

Bonadonna, L. Coliformi totali sul substrato mEndo: un parametro critico nella routine delle analisi microbiologiche. *Tecn Sanitaria* 1994;32:151-9.

ISO 29201. *Water quality – The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods*. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.

ISO 9308-2. *Water quality - Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria – Part 2: most probable number method*. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.

UNI 10674. *Acque destinate al consumo umano – Guida generale per determinazioni microbiologiche.* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.

UNI EN ISO 17994. *Water quality - Criteria for establishing equivalence between microbiological methods*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004.

UNI EN ISO 8199 – *Water quality –General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture.* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.

UNI EN ISO 9308-1. *Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione di Escherichia coli e batteri coliformi - Metodo di filtrazione su membrana*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.

UNI ENV ISO 13843. *Qualità dell'acqua – Guida per la validazione di metodi microbiologici.* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.

DETERMINAZIONE DI *SALMONELLA* SPP.

0. Generalità e definizioni

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Salmonella* rilevato con i metodi ISS Pi 007A rev. 00; ISS Pi 007B rev. 00; ISS Pi 007C rev. 00; ISS Pi 007D rev. 00; ISS Pi 007E rev. 00.

Il genere *Salmonella* comprende microrganismi bastoncellari appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, gram negativi, aerobi e anaerobi facoltativi, C8-esterasi positivi, non fermentanti lattosio, saccarosio e salicina. La morfologia è simile a quella degli altri enterobatteri; sono mobili per la presenza di flagelli peritrichi (eccetto i sierotipi *S.* Gallinarum e *S.* Pullorum che sono immobili). La maggior parte forma fimbrie; alcuni ceppi del sierotipo *S.* Enteritidis e *S.* Typhimurium producono fimbrie sottili, la cui presenza può renderli inagglutinabili con i sieri anti-O. Ad oggi sono riconosciuti non meno di 2400 sierotipi di *Salmonella*, differenziabili sulla base dei diversi caratteri antigenici, antigeni somatici (O), capsulari (Vi) e gli antigeni flagellari (H) che fanno parte rispettivamente della fase I e fase II. I diversi sierotipi sono catalogati secondo lo schema di Kauffmann-White dove ognuno viene definito come specie distinta e denominato sulla base della patologia sostenuta o della sorgente (geografica, animale) del primo isolamento.

Le salmonelle possono trovarsi nell'intestino dell'uomo, degli animali domestici e selvatici; talvolta possono essere isolate dal sangue e dagli organi interni dei vertebrati. L'acidità gastrica è un importante meccanismo di difesa. Tuttavia, alcune specie possono sopravvivere e penetrare nell'epitelio intestinale, anche se solo *S.* Typhi è sistematicamente invasiva. Possono essere responsabili di diffuse patologie nell'uomo, causate da sierotipi ubiquitari ampiamente diffusi negli animali di allevamento (salmonellosi minori). In questo caso, le gastroenteriti sono le manifestazioni morbose che si osservano con maggiore frequenza e sono associate all'ingestione di alimenti e acqua contaminati. La malattia si manifesta di solito con diarrea ed enterocolite di modesta gravità (tranne nei soggetti anziani, nei defedati, negli immunocompromessi e nei bambini) e, generalmente, tende ad una guarigione spontanea. Numerosi possono comunque essere i portatori asintomatici. Salmonellosi sistemiche (tifo e paratifo), trasmesse direttamente da uomo ad uomo attraverso il circuito fecale-orale, sono invece causate esclusivamente da sierotipi adattati all'uomo (*Salmonella* Typhi, e *S.* Paratyphi A, *S.* Schottmuelleri e *S.* Hirschfeldii). In genere sono di modesta gravità ma, in assenza di una adeguata terapia, possono occasionalmente essere anche mortali.

La dose infettante è in funzione del sierotipo e delle condizioni dell'ospite e in genere varia da $10^2 \div 10^3$ (salmonella tifoidea) a $10^4 \div 10^6$ (salmonella non tifoidea). Il periodo di incubazione dell'infezione è variabile e di norma è di (1÷8) giorni con una durata di (2÷10) giorni.

La presenza di salmonelle nell'ambiente idrico è indice di una contaminazione fecale primaria (immissione diretta di scarichi fognari) o secondaria (ad esempio, dilavamento da suoli contaminati). Salmonelle si trovano frequentemente nei liquami, in acque costiere, lacustri e nel suolo dove si moltiplicano però in maniera non significativa.

In acque trattate e disinfettate la presenza di *Salmonella* spp., e di *S.* Typhi in particolare, è tuttavia estremamente rara. La clorazione, infatti, è tuttora considerata un'efficace misura di prevenzione.

Nelle acque di piscina e nelle piscine naturali la presenza di *Salmonella* è un evento abbastanza raro riconducibile sostanzialmente al rilascio di feci da parte di bagnanti infetti o di animali intrusi. Tuttavia, sebbene non inserito tra i parametri da determinare ai sensi

dell'Accordo del 2003, per la determinazione delle salmonelle vengono forniti alcuni metodi per l'analisi di acque di piscine e piscine naturali.

Nelle procedure d'isolamento esistono variazioni e limitazioni causate dalla diversa sensibilità e selettività dei sierotipi di *Salmonella* oggi riconosciuti.

1. Campo di applicazione

Le procedure di analisi ISS Pi 007A rev. 00; ISS Pi 007B rev. 00; ISS Pi 007C rev. 00; ISS Pi 007D rev. 00; ISS Pi 007E rev. 00 vengono utilizzate per il rilevamento di *Salmonella* spp. nelle acque di piscina e di ambienti simili e di piscine naturali.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo ISS Pi 007A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Metodo di Presenza/Assenza. Il metodo consente di valutare la presenza o assenza di *Salmonella* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che comprendono: Prearricchimento, Arricchimento, Isolamento, Conferma biochimica, ed eventualmente, Conferma sierologica.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

2.1.3. Volume da analizzare

Il volume di acqua da analizzare può essere da 1 L a 5 L, che si tratti di acqua di piscine trattate o di piscine naturali.

2.1.4. Terreni di coltura e reagenti

2.1.4.1. Acqua peptonata tamponata

Composizione		
Peptone	10	g
Cloruro di sodio	5	g
Fosfato di sodio bibasico dodecaidrato	9	g
Fosfato di potassio monobasico	1,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Dopo aver sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (121±3)°C. Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

L'acqua peptonata favorisce la rivitalizzazione delle cellule batteriche.

2.1.4.2. Brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis

Composizione		
Peptone di soia	4,5	g
Cloruro di sodio	7,2	g
Fosfato di potassio monobasico	1,26	g
Potassio fosfato bibasico	180	mg
Cloruro di magnesio	13,58	g
Verde malachite ossalato	36	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 5,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo) e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (115±3)°C. Conservare a (5±3)°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

Il brodo di Rappaport Vassiliadis presenta spiccata attività inibitoria verso la flora saprofita, associata ad una buona capacità di stimolare la crescita delle salmonelle. Inibisce comunque la crescita di *S.* Typhi alla temperatura di 42°C. Il substrato contiene magnesio cloruro, classificato come Xi-Iirritante. Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.4.3. Hektoen Enteric Agar

Composizione		
Triptone	12	g
Estratto di lievito	3	g
Sali biliari n. 3	9	g
Lattosio	12	g
Saccarosio	12	g
Salicina	2	g
Cloruro di sodio	5	g
Tiosolfato di sodio	5	g
Citrato ferrico ammoniacale	1,5	g
Agar	15	g
Blu di bromotimolo	65	mg
Fucsina acida	0,1	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Non sterilizzare. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare.

Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e come controllo negativo *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.4.4. Reattivo al 4-metil umbelliferil caprilato

Composizione		
4-metil umbelliferil caprilato	1	%
Eptano	99	%

Prodotto brevettato, disponibile in commercio, da usare e conservare secondo le istruzioni della ditta produttrice. Il prodotto è classificato come infiammabile (F) e irritante (Xi) per la presenza di eptano. Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

2.1.4.5. Triptone Soia Agar

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

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

Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.1.4.6. Soluzione di tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione		
N,N,N',N'- tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto, come diammina aromatica, viene classificato come sostanza tossica e nociva.

2.1.4.7. Agar al ferro di Kliger

Composizione		
Estratto di carne	3	g
Estratto di lievito	3	g
Peptone	20	g
Cloruro di sodio	5	g
Lattosio	10	g
Glucosio	1	g
Ferro citrato	0,3	g
Tiosolfato di sodio	0,3	g
Agar	12	g
Rosso fenolo	50	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo e, dopo sterilizzazione a (121±3)°C per 15 minuti, lasciare solidificare su un piano inclinato per ottenere una superficie a becco di clarino.

Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.4.8. Agar al ferro e lisina

Composizione		
Casitone	5	g
Estratto di lievito	3	g
Destrosio	1	g
L-lisina	10	g
Ferro ammonio citrato	0,5	g
Agar	14,5	g
Tiosolfato di sodio	40	mg
Porpora di bromocresolo	20	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa dissoluzione dei componenti. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo e, dopo sterilizzazione a (121±3)°C per 15 minuti, lasciare solidificare su un piano inclinato per ottenere una superficie a becco di clarino.

Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e come controllo negativo *Shigella flexneri* ATCC 12022; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Fase di prearricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in un idoneo brodo di coltura non selettivo. Sebbene sia consigliabile per la tipologia specifica delle acque da analizzare, la fase di prearricchimento può essere omessa sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti modifiche dei risultati ottenuti. La procedura di seguito riportata tuttavia propone lo svolgimento di tutte le fasi.

Filtrare non meno di 1 L di campione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45 µm (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici 0,7/0,2 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se necessario, per la presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua peptonata tamponata (2.1.4.1.). Incubare a (36±1)°C per (16÷20) ore.

2.1.5.2. Fase di arricchimento

Dal brodo di prearricchimento (2.1.4.1.) eseguire l'inoculo, in rapporto di 1:100, di un'aliquota della brodocoltura in brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis (2.1.4.2.). Incubare a (42±1)°C per (18÷24) ore.

A questa temperatura e per la presenza nel brodo del verde malachite, *S.* Typhi non cresce. La sua ricerca può essere effettuata in brodo alla selenite il cui uso, tuttavia, per l'elevata tossicità del prodotto, richiede precauzioni particolari e l'applicazione di speciali procedure da parte degli operatori, sia nella fase di manipolazione sia in quella di smaltimento.

2.1.5.3. Fase di isolamento e identificazione delle colonie

Prelevando un'ansata dal brodo di arricchimento (2.1.4.2.), eseguire 2 subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento Hektoen Enteric Agar (2.1.4.3.): la prima dopo 18 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 24 ore d'incubazione.

Incubare entrambe le semine a (36±1)°C per (20÷24) ore. Il terreno permette di distinguere facilmente la flora interferente che fermenta lattosio, saccarosio e salicina da *Salmonella* che non fermenta questi zuccheri. Le colonie di *Salmonella* si presentano di colore verde-blu o blu, con odore tipico; di solito è presente un centro nero caratteristico, con viraggio del terreno al blu. *Shigella* cresce come colonie verde chiaro senza viraggio del terreno. I coliformi crescono come colonie color salmone e il terreno vira al rosa tendente all'arancio e si opacizza per la precipitazione dei sali biliari. Le specie di *Proteus* che fermentano la salicina e il saccarosio si sviluppano come colonie rosa-salmone, mentre le specie di *Proteus* non fermentanti crescono come colonie verdi e blu con o senza centro nero. L'analogia morfologica delle colonie di *Proteus* con quelle di *Salmonella* può ingenerare difficoltà nella distinzione primaria del microrganismo target, risolvibile con la prova della C8-esterasi.

2.1.5.4. Prova della C8-esterasi

Per l'accertamento presuntivo dell'appartenenza al genere *Salmonella,* versare sulle colonie sospette una goccia del reattivo al 4-metil umbelliferil caprilato (2.1.4.4.), seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

La reazione è positiva quando si manifesta, entro (3÷5) minuti, una fluorescenza blu. Le salmonelle sono C8-esterasi positive. *Proteus* e *Shigella* sono C8-esterasi negativi.

I valori di Sensibilità del test sono quasi costantemente prossimi al 100%; i valori di Specificità sono maggiormente variabili, ma comunque oscillanti tra l'80% e il 99%.

2.1.5.5. Conferma biochimica

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie sospette al genere *Salmonella* è comunque opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma: prova della presenza della citocromossidasi, della fermentazione dei carboidrati e della decarbossilazione della lisina. È possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione a livello di genere delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio.

Prima di effettuare le prove di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Triptone Soia Agar (2.1.4.5.) incubando a (36±1)°C per (18÷24) ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.1.5.6. Prova della citocromossidasi

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Triptone Soia Agar (2.1.4.5.). Strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.1.4.6.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio.

Una reazione negativa si evidenzia quando non si produce alcuna colorazione; se positiva si sviluppa entro pochi secondi una colorazione blu-violetto. Le salmonelle sono ossidasi-negative.

2.1.5.7. Prova della fermentazione dei carboidrati

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno Triptone Soia Agar (2.1.4.5.), la colonia sospetta e, per infissione e successivo strisciamento, trasferire sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro di Kliger (2.1.4.7.). Incubare a (36±1)°C per (18÷24) ore. È essenziale che i risultati siano registrati dopo (18÷24) ore di incubazione.

Nella Tabella 1 sono riportate le caratteristiche di crescita su Kliger Iron Agar per alcuni enterobatteri.

Tabella 1. Tipo di reazione prodotta da alcuni enterobatteri dall'utilizzazione dei carboidrati su Kliger Iron Agar

Microrganismo	Tipo di reazione		
	Superficie inclinata	Fondo	H_2S
Escherichia	Acida/alcalina	Acida con gas /alcalina	variabile
Klebsiella	Acida	Acida con gas	-
Enterobacter	Acida	Acida /con gas	-
Citrobacter	Acida/alcalina	Acida /con gas	+
Salmonella Paratyphi	Acida/alcalina	Acida	-
Salmonella spp.	Alcalina	Acida /con gas	+
Salmonella Arizonae	Alcalina	Acida /con gas	+
Proteus morganii	nessuna	Acida	-
Proteus vulgaris	nessuna	Acida	+
Shigella	nessuna	Acida	-

Su Kliger Iron Agar reazioni acide producono una colorazione gialla del terreno, quelle alcaline sono evidenziabili dal viraggio del terreno al porpora. Gli stipiti che producono idrogeno solforato determinano un annerimento del terreno.

2.1.5.8. Prova della decarbossilazione della lisina

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno Triptone Soia Agar (2.1.4.5.), la colonia sospetta e, per infissione e successivo strisciamento, trasferire sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro e lisina (2.1.4.8.). Incubare a (36±1)°C per (18÷24) ore.

I microrganismi, appartenenti al genere *Salmonella* producono una reazione alcalina color viola sia nel becco sia nel cilindro; invece, una reazione acida di colore giallo indica una reazione negativa. Gli stipiti che producono idrogeno solforato determinano un annerimento del terreno per la precipitazione di solfuro di ferro.

2.1.5.9. Conferma sierologica

Qualora si ritenga necessario, si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* possono essere tipizzati in base alla classificazione di Kauffmann-White utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento per la *Salmonella*. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

2.1.6. Espressione dei risultati

Considerare prodotte da *Salmonella* le colonie che sono state individuate sulla base delle caratteristiche colturali, biochimiche ed eventualmente sierologiche.

Riportare il risultato ottenuto come *Salmonella* Assente o Presente in 1 L e, se del caso, il sierotipo individuato.

2.2. Metodo ISS Pi 007B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

I *Metodo di Presenza/Assenza*. Il metodo consente di valutare la presenza o assenza di *Salmonella* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che comprendono: Prearricchimento, Arricchimento, Isolamento, Conferma biochimica, ed eventualmente, Conferma sierologica.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

2.2.3. Volume da analizzare

Il volume di acqua da analizzare può essere da 1 L a 5 L, che si tratti di acqua di piscine trattate o di piscine naturali.

2.2.4. Terreni di coltura e reagenti

2.2.4.1. Acqua peptonata tamponata

Composizione		
Peptone	10	g
Cloruro di sodio	5	g
Fosfato di sodio bibasico dodecaidrato	9	g
Fosfato di potassio monobasico	1,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Dopo aver sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (121±3)°C. Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

L'acqua peptonata favorisce la rivitalizzazione delle cellule batteriche.

2.2.4.2. Brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis

Composizione		
Peptone di soia	4,5	g
Cloruro di sodio	7,2	g
Fosfato di potassio monobasico	1,26	g
Potassio fosfato bibasico	180	mg
Cloruro di magnesio	13,4	g
Verde malachite ossalato	36	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 5,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo) e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (115±3)°C. Conservare a (5±3)°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

Il brodo di Rappaport Vassiliadis presenta spiccata attività inibitoria verso la flora saprofita, associata ad una buona capacità di stimolare la crescita delle salmonelle. Inibisce comunque la crescita di *S*. Typhi alla temperatura di 42°C. Il substrato contiene magnesio cloruro, classificato come irritante (Xi). Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.2.4.3. Terreno di base Chromogenic Salmonella Agar

Composizione		
Peptone	10	g
Miscela di inibitori	12	g
Miscela di cromogeni	0,9	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno si trova in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Aggiungere il supplemento A (2.2.4.4.). Portare ad ebollizione sotto agitazione. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per 15 minuti. Raffreddare alla temperatura di (50±5)°C. Aggiungere il supplemento B (2.2.4.5.) in condizioni asettiche. Mescolare con cura.

Il preparato è classificato come irritante (Xi) per la presenza di sodio desossicolato e sodio tiosolfato. Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

2.2.4.4. Supplemento A

Composizione		
Agenti emulsionanti	11,4	mL

Il supplemento si trova in commercio già ponto per l'uso. Aggiungere il supplemento ad 1 L di terreno di base (2.2.4.3.). Mescolare accuratamente e portare ad ebollizione sotto agitazione. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per 15 minuti.

2.2.4.5. Supplemento B

Composizione		
Cefsulodina	5	mg
Acqua distillata sterile	4	mL

Il supplemento si trova in commercio già pronto per l'uso. Sciogliere il supplemento in 4 mL di acqua distillata sterile.

Aggiungere, in condizioni di asepsi, il supplemento ad 1 L di terreno di base (2.2.4.3.) addizionato del supplemento A e sterilizzato.

2.2.4.6. Terreno completo Chromogenic Salmonella Agar

Composizione		
Terreno di base (2.2.4.3.)	1000	mL
Supplemento A (2.2.4.4.)	11,4	mL
Sol. di supplemento B (2.2.4.5.)	4	mL
pH 7,2±0,2		

Dopo avere aggiunto i supplementi al terreno di base, distribuire in capsule di Petri. Lasciare solidificare. Conservare a (5±3)°C per non più di una settimana.

La selettività del terreno è garantita da una miscela di inibenti, che comprendono: cefalosporina, attiva nell'inibizione della crescita di *Pseudomonas* spp., sali biliari, attivi nella soppressione dei batteri Gram positivi e di alcuni Gram negativi, Tergitol 4, inibitore nella crescita del *Proteus* spp.

Il terreno è adatto anche per l'isolamento di *Salmonella* Paratyphi e di *S.* Typhi. Il sistema selettivo-differenziale del terreno permette di isolare anche i rari ceppi di *Salmonella* fermentanti il lattosio.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e come controllo negativo *Ps. aeruginosa* ATCC 27853; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.2.4.7. Triptone Soia Agar

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

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

Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.2.4.8. Soluzione di tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione		
N,N,N',N'- tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto, come diammina aromatica, viene classificato come sostanza tossica e nociva.

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Fase di prearricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo. Sebbene sia consigliabile per la tipologia specifica delle acque da analizzare, la fase di prearricchimento può essere omessa sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti modifiche dei risultati ottenuti. La procedura di seguito riportata tuttavia propone lo svolgimento di tutte le fasi.

Filtrare non meno di 1 L di campione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45 µm (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici 0,7/0,2 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se necessario, per la presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua peptonata tamponata (2.2.4.1.). Incubare a (36±1)°C per (16÷20) ore.

2.2.5.2. Fase di arricchimento

Dal brodo di prearricchimento (2.2.4.1.) eseguire l'inoculo, in rapporto di 1:100, di un'aliquota della brodocoltura in brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis (2.2.4.2.). Incubare a (42±1)°C per (18÷24) ore.

A questa temperatura e per la presenza nel brodo del verde malachite, *S.* Typhi non cresce. La sua ricerca può essere effettuata in brodo alla selenite il cui uso, tuttavia, per l'elevata tossicità del prodotto, richiede precauzioni particolari e l'applicazione di speciali procedure da parte degli operatori sia nella fase di manipolazione sia in quella di smaltimento.

2.2.5.3. Fase di isolamento e identificazione delle colonie

Prelevando un'ansata dal brodo di arricchimento (2.2.4.2.), eseguire 2 subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento Chromogenic Salmonella Agar (2.2.4.5.): la prima dopo 18 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 24 ore.

Incubare entrambe le semine a (36±1)°C per (20÷24) ore. Le colonie sospette di *Salmonella, Salmonella* lac+ e *Salmonella* Typhi si presentano di colore rosso-magenta (colonie C8-esterasi positive). Le colonie di *E. coli*, oltre ad avere una crescita scarsa, si presentano incolori ed *Enterobacter* e *Klebsiella,* che crescono con difficoltà, presentano colonie di colore verde-blu. *Pseudomonas* spp. è generalmente inibito, come pure i batteri Gram positivi. Raramente *Pseudomonas* e *Aeromonas* crescono come colonie di colore rosso-magenta (colonie C8-esterasi positive). *Proteus* spp. presenta una crescita scarsa e le colonie eventualmente presenti sono di colore marrone chiaro o verde.

2.2.5.4. Conferma biochimica

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie sospette al genere *Salmonella* è opportuno procedere allo svolgimento della prova della citocromossidasi per distinguere i rari ceppi di *Pseudomonas* e *Aeromonas* che formano colonie di colore rosso-magenta. È possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione a livello di genere delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio.

Prima di effettuare la prova di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Triptone Soia Agar (2.2.4.7.) incubando a (36±1)°C per (18÷24) ore. Eseguire la prova su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.2.5.5. Prova della citocromossidasi

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Triptone Soia Agar (2.2.4.7.). Strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo

(2.2.4.8.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio.

Una reazione negativa si evidenzia quando non si produce alcuna colorazione; se positiva si sviluppa entro pochi secondi una colorazione blu-violetto. Le salmonelle sono ossidasi-negative.

2.2.5.6. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* possono essere tipizzati in base alla classificazione di Kauffmann-White utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento per la *Salmonella*. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

2.2.6. Espressione dei risultati

Considerare prodotte da *Salmonella* le colonie che sono state individuate sulla base delle caratteristiche colturali, biochimiche ed eventualmente sierologiche.

Riportare il risultato ottenuto come *Salmonella* Assente o Presente in 1 L e, se del caso, il sierotipo individuato.

2.3. Metodo ISS Pi 007C rev. 00

2.3.1. Principio del metodo

Metodo di Presenza/Assenza. Il metodo consente di valutare la presenza o assenza di *Salmonella* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che comprendono: Prearricchimento, Arricchimento, Isolamento, Conferma biochimica, ed eventualmente, Conferma sierologica.

2.3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

2.3.3. Volume da analizzare

Il volume di acqua da analizzare può essere da 1 L a 5 L, che si tratti di acqua di piscine trattate o di piscine naturali.

2.3.4. Terreni di coltura e reagenti

2.3.4.1. Acqua peptonata tamponata

Composizione		
Peptone	10	g
Cloruro di sodio	5	g
Fosfato di sodio bibasico dodecaidrato	9	g
Fosfato di potassio monobasico	1,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Dopo aver sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (121±3)°C. Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

L'acqua peptonata favorisce la rivitalizzazione delle cellule batteriche.

2.3.4.2. Brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis

Composizione		
Peptone di soia	4,5	g
Cloruro di sodio	7,2	g
Fosfato di potassio monobasico	1,26	g
Potassio fosfato bibasico	180	mg
Cloruro di magnesio	13,4	g
Verde malachite ossalato	36	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 5,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo) e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (115±3)°C. Conservare a (5±3)°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

Il brodo di Rappaport Vassiliadis presenta spiccata attività inibitoria verso la flora saprofita, associata ad una buona capacità di stimolare la crescita delle salmonelle. Inibisce comunque la crescita di *S.* Typhi alla temperatura di 42°C. Il substrato contiene magnesio cloruro, classificato come irritante (Xi). Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.3.4.3. Agar Rambach

Composizione		
Peptone	8	g
Cloruro di sodio	5	g
Desossicolato di sodio	1	g
Miscela cromogena	1,5	g
Glicol propilenico	10,5	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova in commercio e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

In funzione della quantità di terreno da preparare, aggiungere un volume di acqua distillata alla miscela cromogena già pronta nella confezione. Agitare fino alla completa dissoluzione dei componenti. Aggiungere la fiala del terreno disidratato e riscaldare agitando frequentemente. Il tempo di solubilizzazione di una sospensione di 250 mL è di (20÷25) minuti; per la solubilizzazione di 1000 mL di terreno sono necessari (35÷40) minuti Non sterilizzare, non surriscaldare. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare.

Conservare ad una temperatura non inferiore a (5±3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali. Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare colture di riferimento certificate.

Il substrato è classificato come tossico nocivo (Xn) e irritante (Xi) per la presenza di sodio desossicolato e Tris(idrossimetil-aminometano). Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

2.3.4.4. Triptone Soia Agar

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

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

Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.3.4.5. Soluzione di tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione		
N,N,N',N'- tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto, come diammina aromatica, viene classificato come sostanza tossica e nociva.

2.3.5. Procedura

2.3.5.1. Fase di prearricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo. Sebbene sia consigliabile per la tipologia specifica delle acque da analizzare, la fase di prearricchimento può essere omessa sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti modifiche dei risultati ottenuti. La procedura di seguito riportata tuttavia propone lo svolgimento di tutte le fasi.

Filtrare non meno di 1 L di campione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro , con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45 μm (pori simmetrici da 0,45 μm oppure pori asimmetrici 0,7/0,2 μm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se necessario, per la presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua peptonata tamponata (2.3.4.1.). Incubare a (36±1)°C per (16÷20) ore.

2.3.5.2. Fase di arricchimento

Dal brodo di prearricchimento (2.3.4.1.) eseguire l'inoculo, in rapporto di 1:100, di un'aliquota della brodocoltura in brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis (2.3.4.2.). Incubare a (42±1)°C per (18÷24) ore.

A questa temperatura e per la presenza nel brodo del verde malachite, *S.* Typhi non cresce. La sua ricerca può essere effettuata in brodo alla selenite il cui uso, tuttavia, per l'elevata tossicità del prodotto, richiede precauzioni particolari e l'applicazione di speciali procedure da parte degli operatori sia nella fase di manipolazione sia in quella di smaltimento.

2.3.5.3. Fase di isolamento e identificazione delle colonie

Prelevando un'ansata dal brodo di arricchimento (2.3.4.2.), eseguire 2 subcolture per strisci multipli sul terreno di isolamento Rambach Agar (2.3.4.3.): la prima dopo 18 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 24 ore.

Incubare entrambe le semine a a (36±1)°C per (24÷48) ore. Il genere *Salmonella*, escluse *S.* Typhi e *S.* Paratyphi A, forma colonie rosso intenso, con viraggio di colore del terreno al rosa intenso (a 24 ore sono abitualmente presenti un anello incolore alla periferia delle colonie e un anello di terreno non virato al rosa intorno alle colonie medesime; entrambi gli anelli scompaiono nelle 24 ore successive); *S.* Typhi e *S.* Paratyphi A crescono come colonie incolori/gialle; *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* si presentano con colonie verdi-blu. *Proteus mirabilis* e *Shigella flexneri* formano colonie beige, *Pseudomonas* colonie color salmone, mentre *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* sono inibiti.

2.3.5.4. Conferma biochimica

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie sospette al genere *Salmonella* è opportuno procedere allo svolgimento della prova della citocromossidasi. È possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione a livello di genere delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio.

Prima di effettuare la prova è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Triptone Soia Agar (2.3.4.4.) incubando a (36±1)°C per (18÷24) ore. Eseguire la prova su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

2.3.5.5. Prova della citocromossidasi

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno Triptone Soia Agar (2.3.4.4.). Strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (2.3.4.5.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio.

Una reazione negativa si evidenzia quando non si produce alcuna colorazione; se positiva si sviluppa entro pochi secondi una colorazione blu-violetto. Le salmonelle sono ossidasi-negative.

2.3.5.6. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* possono essere tipizzati in base alla classificazione di Kauffmann-White utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento per la *Salmonella*. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

2.3.6. Espressione dei risultati

Considerare prodotte da *Salmonella* le colonie che sono state individuate sulla base delle caratteristiche colturali, biochimiche ed eventualmente sierologiche.

Riportare il risultato ottenuto come *Salmonella* Assente o Presente in 1 L e, se del caso, il sierotipo individuato.

2.4. Metodo ISS Pi 007D rev. 00

2.4.1. Principio del metodo

Metodo di Presenza/Assenza. Il metodo consente di valutare la presenza o assenza di *Salmonella* in un determinato volume di acqua. È possibile che il metodo non rilevi *Salmonella* Typhi e Paratyphi.

La procedura analitica consiste di quattro fasi successive. È spesso necessario un pre-arricchimento per permettere il rilevamento di basse concentrazioni di *Salmonella* o di salmonelle danneggiate. Alcune *Salmonella* e quelle che presentano danni subletali possono richiedere un tempo di incubazione aggiuntivo. Inoltre, *Salmonella* può essere presente in basse concentrazioni spesso accompagnate da numeri considerevolmente più grandi di altri membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae* o di altre famiglie. Generalmente si rende quindi necessario anche un arricchimento selettivo. Seguono poi le fasi di isolamento, conferma biochimica, ed eventualmente, conferma sierologica.

Per un approccio semi-quantitativo, possono essere eseguite prove per il numero più probabile (MPN) usando volumi di campione appropriati. In questi casi, il volume di acqua peptonata tamponata è adattato di conseguenza.

Il metodo è in linea con la norma UNI EN ISO 19250.

2.4.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

2.4.3. Volume da analizzare

Il volume di acqua da analizzare può essere da 1 L a 5 L, che si tratti di acqua di piscine trattate o di piscine naturali.

Iniziare l'analisi preferibilmente subito dopo aver raccolto il campione. Se il campione è mantenuto a temperatura ambiente iniziare l'analisi entro 12 ore dal prelievo. In circostanze eccezionali è consentito conservare i campioni in frigorifero a (5±3)°C e iniziare l'analisi entro le 24 ore.

2.4.4. Terreni di coltura e reagenti

2.4.4.1. Acqua peptonata tamponata

Composizione		
Peptone	10	g
Cloruro di sodio	5	g
Fosfato di sodio bibasico dodecaidrato	9	g
Fosfato di potassio monobasico	1,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Dopo aver sciolto la polvere, distribuire in beute di capacità appropriata e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (121±3)°C. Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

L'acqua peptonata favorisce la rivitalizzazione delle cellule batteriche.

2.4.4.2. Brodo alla selenite e cistina

Composizione		
Triptone	5	g
Lattosio	4	g
Sodio fosfato bibasico	10	g
Sodio biselenito	4	g
L-cistina	0,01	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sciogliere 4 g di sodio biselenito in 1 litro di acqua distillata; quando è sciolto aggiungere gli altri ingredienti. Scaldare per sciogliere il terreno, distribuire in beute. Sterilizzare a vapore fluente per 15 minuti. Non autoclavare. Conservare a (5±3)°C al buio.

Il sodio biselenito è corrosivo a contatto con la pelle e produce effetti tossici se inalato o ingerito, inoltre ha effetti teratogeni e può causare aborti. Esentare dall'uso il personale di laboratorio in stato di gravidanza. Proteggere le mani e il volto durante l'uso. Per ridurre al minimo ogni possibile rischio di teratogenicità per gli operatori di laboratorio, il sodio biselenito non è aggiunto come polvere ma dovrebbe essere preparato separatamente come soluzione alla quale sono aggiunti i rimanenti ingredienti. Utilizzare, per la preparazione, una cappa chimica e dispositivi di protezione individuale (DPI).

2.4.4.3. Brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis

Composizione		
Peptone di soia	4,5	g
Cloruro di sodio	7,2	g
Fosfato di potassio monobasico	1,26	g
Potassio fosfato bibasico	180	mg
Cloruro di magnesio	13,58	g
Verde malachite ossalato	36	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 5,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo) e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (115±3)°C. Conservare a (5±3)°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

Il brodo di Rappaport Vassiliadis presenta spiccata attività inibitoria verso la flora saprofita, associata ad una buona capacità di stimolare la crescita delle salmonelle. Inibisce comunque la crescita di *S*. Typhi alla temperatura di 42°C. Il substrato contiene magnesio cloruro, classificato come irritante (Xi). Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.4.4.4. Brodo di base al tetrationato di Muller-Kauffmann

Composizione		
Peptone di soia	2,3	g
Triptone	7	g
Cloruro di sodio	2,3	g
Calcio carbonato	25	g
Sodio tiosolfato	40,7	g
Sali biliari	4,75	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 8,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare a bagnomaria bollente agitando frequentemente fino a completa solubilizzazione. Non autoclavare. Il terreno di base può essere conservato fino a quattro settimane a (5±3)°C.

Il terreno è classificato Xi-Irritante; consultare la scheda di sicurezza prima dell'uso.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

Preparare il terreno completo al momento dell'uso.

2.4.4.5. Soluzione di iodio

Composizione		
Iodio	20	g
Potassio ioduro	25	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere lo ioduro di potassio in 10 mL di acqua distillata, aggiungere lo iodio e riscaldare leggermente fino a completa solubilizzazione. Portare al volume finale di 100 mL con acqua distillata. Conservare la soluzione preparata al buio a temperatura ambiente in un contenitore ben chiuso.

2.4.4.6. Soluzione di verde brillante

Composizione		
Verde brillante	0,1	g
Acqua distillata	100	mL

Aggiungere il verde brillante all'acqua distillata e agitare sino a completa solubilizzazione del colorante. Riscaldare la soluzione a 100°C per 30 minuti e agitare periodicamente durante il raffreddamento per assicurarsi che il colorante si sia completamente disciolto. Conservare al buio in contenitori di vetro scuro.

2.4.4.7. Soluzione di novobiocina

Composizione		
Novobiocina sale sodico	0,04	g
Acqua distillata	5	mL

Sciogliere il sale sodico di novobiocina in acqua distillata e sterilizzare per filtrazione. Conservare fino a quattro settimane a (3±2)°C.

2.4.4.8. Brodo al tetrationato di Muller-Kauffmann completo

Composizione		
Terreno base (2.4.4.4.)	1000	mL
Soluzione di iodio (2.4.4.5.)	19	mL
Soluzione di verde brillante (2.4.4.6.)	9,5	mL
Soluzione di novobiocina (2.4.4.7.)	5	mL

Dopo aver preparato il terreno base lasciarlo raffreddare sotto i 45°C e aggiungere subito prima dell'uso 5 mL della soluzione di novobiocina, agitare e aggiungere 19 mL di soluzione di iodio e 9,5 mL della soluzione di verde brillante. Mescolare bene e distribuire in provette o beute. Usare il terreno completo nella giornata di preparazione.

2.4.4.9. Xilosio Lisina Desossicolato Agar (XLD)

Composizione		
Estratto di lievito	3	g
L-lisina cloridrato	5	g
Xilosio	3,75	g
Lattosio	7,5	g
Saccarosio	7,5	g
Sodio desossicolato	1	g
Cloruro di sodio	5	g
Tiosolfato di sodio	6,8	g
Citrato ferrico ammoniacale	0,8	g
Rosso fenolo	0,08	g
Agar	12,5	
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Non surriscaldare. Non autoclavare. Raffreddare immediatamente in un bagnomaria a 50°C. Un riscaldamento eccessivo o un raffreddamento prolungato possono causare precipitazione. Versare nelle piastre non appena il terreno si è un po' raffreddato. Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e come controllo negativo *Escherichia coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

2.4.4.10. Triptone Soia Agar (TSA)

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 minuti. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5±3)°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

2.4.4.11. Agar al ferro di Kliger

Composizione		
Estratto di carne	3	g
Estratto di lievito	3	g
Peptone	20	g
Cloruro di sodio	5	g
Lattosio	10	g
Glucosio	1	g
Ferro citrato	0,3	g
Tiosolfato di sodio	0,3	g
Agar	12	g
Rosso fenolo	0,025	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo e, dopo sterilizzazione a (121±3)°C per 15 minuti, lasciare solidificare su un piano inclinato per ottenere una superficie a becco di clarino.

Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.4.4.12.Terreno di base all'Urea Agar (Terreno di Christensen)

Composizione		
Peptone	1	g
Glucosio	1	g
Cloruro di sodio	5	g
Sodio fosfato bibasico	1,2	g
Potassio fosfato monobasico	0,8	g
Rosso fenolo	0,012	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, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere 24 g di polvere in 950 mL di acqua

distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente, sterilizzare a (121±3)°C per 15 minuti. Conservare fino a un mese a (5±3)°C.

2.4.4.13. Soluzione di urea

Composizione		
Urea	400	g
Acqua distillata a un volume finale di	1000	mL

Sciogliere l'urea in acqua e sterilizzare la soluzione per filtrazione. Conservare fino a un mese a (5±3)°C.

2.4.4.14. Terreno all'Urea Agar completo (Terreno di Christensen)

Composizione		
Urea Agar base (2.4.4.12.)	950	mL
Soluzione di urea (2.4.4.13.)	50	mL

Raffreddare il terreno di base all'Urea Agar a 50°C e aggiungere in modo asettico 50 mL della soluzione di urea al 40% (2.4.4.13). Mescolare bene, distribuire aliquote di 10 mL del terreno completo in provette sterili e fare solidificare a becco di clarino. Conservare le provette fino a 7 giorni a (5±3)°C.

2.4.4.15. Agar al ferro e lisina

Composizione		
Peptone	5	g
Estratto di lievito	3	g
Glucosio	1	g
L-lisina	10	g
Ferro ammonio citrato	0,5	g
Tiosolfato di sodio	40	mg
Porpora di bromocresolo	20	mg
Agar	14,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa solubilizzazione dei componenti. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo e, dopo sterilizzazione a (121±3)°C per 15 minuti, lasciare solidificare su un piano inclinato per ottenere una superficie a becco di clarino.

Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.4.5. Procedura

2.4.5.1. Fase di prearricchimento

Per il prearricchimento possono essere utilizzati uno o due brodi (2.4.4.1. e 2.4.4.2.). Filtrare un volume di acqua appropriato per l'acqua da esaminare attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei

pori nominale di 0,45 µm (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici 0,7/0,2 µm). Trasferire asetticamente la membrana in 50 mL di acqua peptonata tamponata (2.4.4.1.).

In alternativa aggiungere direttamente il campione allo stesso volume di acqua peptonata tamponata (2.4.4.1.) a doppia concentrazione Incubare le colture a (36±1)°C per (18±2) ore.

Eventualmente procedere in modo analogo se si usa anche il Brodo alla Selenite e Cistina (2.4.4.2.).

2.4.5.2. Fase di arricchimento

Se il/i brodo/i di arricchimento sono stati conservati in frigo lasciarli a temperatura ambiente per almeno un'ora. Trasferire 0,1 mL della brodocoltura ottenuta in (2.4.5.1) in una provetta contenente 10 mL di brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis (2.4.4.3.). Incubare il brodo a (41±1)°C per (24±3) ore. Non superare la temperatura di incubazione massima (42°C). Per rilevare salmonelle a crescita lenta, incubare il brodo di arricchimento per ulteriori (24±3) ore fino ad un totale di (48±4) ore a (41±1)°C.

In indagini epidemiologiche può essere rilevante la ricerca di *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A, mentre non lo è generalmente nel monitoraggio di routine della qualità dell'acqua. In questo caso usare il brodo al tetrationato-novobiocina di Muller-Kauffmann (MKTTn) (2.4.4.8.) per l'arricchimento il quale rileva un maggior numero di salmonelle, inclusi alcuni ceppi di *Salmonella* Paratyphi, ma si ritiene che non sia in grado di recuperare ceppi di *Salmonella* Paratyphi C. Non usare il brodo MKTTn se si sospetta la presenza di *Salmonella* Typhi dopo l'uso del brodo al selenite e cistina (2.4.4.2.).

Quando si usa il Muller-Kauffmann con tetrationato e novobiocina, trasferire 1 mL della brodocoltura ottenuta in (2.4.5.1) in una provetta contenente 10 mL del brodo al tetrationato-novobiocina di Muller-Kauffmann (2.4.4.8.) e incubare a (36±1)°C fino a (24±3) ore.

2.4.5.3. Fase di isolamento

Prelevando un'ansata dal brodo di arricchimento, dopo l'incubazione di (24±3) ore e, se necessario, di (48±4) ore, inoculare in terreni selettivi per ottenere colonie ben isolate:

- xilosio lisina desossicolato agar (XLD agar) (2.4.4.9.). Incubare le piastre capovolte a (36±1)°C per (24±3) ore;
- eventualmente un terreno selettivo aggiuntivo, adatto per l'isolamento delle salmonelle lattosio-positive e dei ceppi di *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi. Il laboratorio può scegliere quale terreno usare come secondo terreno di isolamento: Verde Brillante agar (VBA), il Bismuto solfito agar, ecc. Seguire le istruzioni della ditta produttrice per la preparazione e l'uso.

Analogamente, dal brodo al tetrationato-novobiocina di Muller-Kauffman, dopo incubazione a (36±1)°C per (24±3) ore, ripetere la procedura seguita nel punto 2.4.5.3. sui due terreni selettivi di isolamento.

2.4.5.4. Conferma

Per la conferma, da ogni terreno selettivo agarizzato, isolare almeno una colonia considerata tipica come *Salmonella* presuntiva. Se una prima colonia non è confermata come *Salmonella*, allora prendere altre quattro colonie.

Sull'XLD Agar, le colonie tipiche di *Salmonella* generalmente si presentano con centro nero e una zona intorno leggermente trasparente di colore rossastro dovuto al cambiamento di colore dell'indicatore del terreno.

Il riconoscimento delle colonie di *Salmonella* è in larga misura una questione di esperienza e la loro morfologia può variare alquanto, non solo da sierotipo a sierotipo, ma anche da lotto a lotto del terreno selettivo usato. *Shigella*, *Providencia* e *Salmonella* spp. H_2S-negative (ad esempio, *Salmonella* Paratyphi A) appaiono rosa con centro rosa scuro; *Salmonella* lattosio-

positive cresciute su XLD sono gialle con o senza annerimento; le *Enterobacteriaceae*, ad esempio *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus* e *Serratia* crescono come colonie gialle opache.

Strisciare le colonie selezionate sulla superficie di piastre di terreno non selettivo (ad esempio TSA 2.4.4.10.) al fine di ottenere lo sviluppo di colonie ben isolate. Incubare le piastre inoculate a (36±1)°C per (24±3) ore. Se l'isolamento fallisce, ripetere la procedura in modo da assicurarsi che si ottengano singole colonie separate. Per la conferma biochimica e, se opportuno, sierologica utilizzare singole colonie isolate con non più di 24 ore di sviluppo. È possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione a livello di genere delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio. In questo caso seguire le istruzioni della ditta produttrice.

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie sospette al genere *Salmonella* è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma: prova della fermentazione dei carboidrati, della decarbossilazione della lisina e prova dell'ureasi.

2.4.5.5. Prova della fermentazione dei carboidrati

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno TSA (2.4.4.10.), la colonia sospetta e, per infissione e successivo strisciamento, trasferire sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro di Kliger (2.4.4.11.). Incubare a (36±1)°C per (18÷24) ore. È essenziale che i risultati siano registrati dopo (18÷24) ore di incubazione.

Reazioni acide producono una colorazione gialla del terreno, quelle alcaline sono evidenziabili dal viraggio del terreno al porpora. Gli stipiti che producono idrogeno solforato determinano un annerimento del terreno. In Tabella 2 sono riportate le interpretazioni delle variazioni osservate nel terreno per la fermentazione dei carboidrati.

Tabella 2. Interpretazione del viraggio dell'Agar al ferro di Kliger

Osservazione	Interpretazione
Fondo	
Giallo (acidità)	Glucosio positivo (fermentazione del glucosio)
Rosso o invariato (alcalinità)	Glucosio negativo (glucosio non fermentato)
Annerimento	Produzione di H_2S
Presenza di bolle o rottura dell'agar	Produzione di gas dal glucosio
Superficie inclinata	
Gialla (acidità)	Lattosio positivo (utilizzo del lattosio)
Rossa (alcalinità)	Lattosio negativo (lattosio non utilizzato)

Nella Tabella 1, al punto 2.1.5.7., sono riportate le caratteristiche di crescita su Agar al ferro di Kliger per alcuni microrganismi.

2.4.5.6. Prova della decarbossilazione della lisina

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno TSA (2.4.4.10.), la colonia sospetta e, per infissione e successivo strisciamento, trasferire sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro e lisina (2.4.4.15.). Incubare a (36±1)°C per (18÷24) ore.

I microrganismi, appartenenti al genere *Salmonella* producono una reazione alcalina color viola sia nel becco sia nel cilindro; invece, una reazione acida di colore giallo indica una reazione negativa. Gli stipiti che producono idrogeno solforato determinano un annerimento del terreno per la precipitazione di solfuro di ferro.

2.4.5.7. Prova dell'ureasi

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno TSA (2.4.4.10.), la colonia sospetta e, strisciare sulla superficie inclinata del terreno all'Urea Agar (2.4.4.14.). Incubare a (36±1)°C fino a 24 ore e controllare ad intervalli ripetuti. Se la reazione è positiva, l'idrolisi dell'urea libera ammoniaca, che vira il colore del rosso fenolo al rosa e successivamente al rosso ciliegia. La reazione è spesso evidente dopo 2÷4 ore. Le colture di *Salmonella* tipica mostrano una reazione negativa, cioè non si osserva viraggio del terreno.

2.4.5.8. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* possono essere tipizzati in base alla classificazione di Kauffmann-White utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento per la *Salmonella*. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

2.4.6. Interpretazione dei risultati

In accordo con i risultati delle prove biochimiche e della eventuale conferma sierologica, riportare il risultato ottenuto come *Salmonella* Assente o Presente nel volume esaminato e, se del caso, il sierotipo individuato.

2.5. Metodo ISS Pi 007E rev. 00

2.5.1. Principio del metodo

Metodo di Presenza/Assenza. Il metodo consente di valutare la presenza o assenza di *Salmonella* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive. Viene inizialmente effettuata una fase di prearricchimento, seguita dall'estrazione del DNA e successiva reazione a catena della polimerasi (PCR) con *primer* specifici. I *primer* utilizzati per la ricerca di *Salmonella* spp. amplificano una sequenza del gene *invA*. Il gene *invA* gene è collocato sulla *pathogenicity island* 1.

2.5.2. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A) è necessario disporre di:

- apparecchio per corsa elettroforetica;
- bagnomaria termostatato;
- generatore di corrente;
- termociclatore;
- trans illuminatore;
- vaschetta per gel.

2.5.3. Volume da analizzare

Il volume di acqua da analizzare può essere da 1 L a 5 L, che si tratti di acqua di piscine trattate o di piscine naturali.

2.5.4. Terreni di coltura e reagenti

2.5.4.1. Acqua peptonata

Composizione		
Peptone	10	g
Cloruro di sodio	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Dopo aver sciolto la polvere distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (121±3)°C. Conservare a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

L'acqua peptonata favorisce la rivitalizzazione delle cellule batteriche.

2.5.4.2. Chelex-100 (20%)

Composizione		
Chelex-100	1	g
Acqua distillata	5	mL

Mescolare i componenti.

2.5.4.3. Soluzione stock di proteinasi K

Composizione
Proteinasi K
Acqua distillata

Risospendere l'enzima liofilizzato in un volume noto di acqua distillata a concentrazione di 20 mg/mL e lasciare tutta la notte la soluzione a (5±3)°C. Successivamente conservare a circa -20°C.

2.5.4.4. Kit per PCR

Composizione
Soluzione di $MgCl_2$;
Tampone di PCR;
Oligonucleotidi (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);
Polimerasi

Conservare a circa -20°C.

2.5.4.5. *Primer* per PCR

139: 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA-3'
141: 5'- GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA-3'

Risospendere i *primer* liofilizzati in acqua deionizzata sterile in modo da ottenere una soluzione 100 µM. Agitare la soluzione mediante vortex per qualche minuto e tenere a (5±3)°C tutta la notte. La concentrazione dei *primer* può essere verificata allo spettrofotometro. La lettura viene eseguita a 260 nm. Conservare a circa -20°C.

2.5.4.6. Soluzione stock di bromuro di etidio

Composizione		
Bromuro di etidio	100	mg
Acqua distillata	10	mL

Sciogliere su agitatore magnetico il bromuro di etidio in polvere in acqua deionizzata sterile. Trasferire la soluzione così ottenuta in provette da 1,5 mL, preparando diverse aliquote, e conservare al buio a (5±3)°C.

Il bromuro di etidio è mutageno e può provocare alterazioni genetiche ereditarie. È irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. Nocivo per ingestione. Altamente tossico per inalazione. Usare sotto cappa e con DPI. Il prodotto non deve essere smaltito in fogna. In sostituzione sono disponibili in commercio intercalanti del DNA di tipo diverso con minori indicazioni di rischio per la salute (es. gel-red).

2.5.4.7. Soluzione TAE 50X (100 mL)

Composizione		
Tris	24,2	g
$EDTANa_2$ 0,5 M, pH 8	10	mL
Acido acetico glaciale	5,7	mL
Acqua distillata (volume finale)	100	mL

Sciogliere il Tris in 60 mL di acqua distillata, aggiungere $EDTANa_2$ e acido acetico glaciale. Portare a volume finale di 100 mL con acqua distillata, filtrare e sterilizzare per 15 minuti.

2.5.4.8. Soluzione TAE 1X

Composizione		
TAE 50x	20	mL
Acqua distillata	980	mL

Mescolare i due componenti.

2.5.4.9. EDTA Na_2 0,5M, pH 8 (400 mL)

Composizione		
$EDTANa_2$ $2H_2O$	74,4	g
Acqua distillata (volume finale)	400	mL

Sciogliere l'$EDTANa_2$ in 300 mL di acqua distillata e portare a pH (8±0,2) con HCl o NaOH 0,1 N. Portare a volume finale di 400 mL con acqua distillata.

2.5.4.10. Tampone di caricamento (Orange G)

Composizione		
Orange G	20	mg
Glicerolo	5	mL
Acqua distillata	10	mL

Mescolare i componenti.

2.5.4.11. Gel di agarosio 2% (100 mL)

Composizione		
Agarosio	2	g
TAE 1x	100	mL
Bromuro di etidio	5	µL

Sciogliere l'agarosio nel TAE 1x (2.5.4.8.) scaldando leggermente fino a completa solubilizzazione della polvere. Aggiungere il bromuro di etidio e mescolare. Versare la soluzione nello stampo per il gel, posizionare lo spaziatore e attendere fino a completa solidificazione. Togliere lo spaziatore e porre il gel nella vaschetta della corsa elettroforetica riempita con TAE 1X (2.5.4.8.). Effettuare la corsa a 70 V per 1 ora. Osservare il gel al trans illuminatore.

2.5.4.12. Pesi molecolari 100-1000 pb

Utilizzare marcatore di peso molecolare per DNA (100-1000 pb) pronto all'uso.

2.5.5. Procedura

2.5.5.1. Fase di prearricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo. Filtrare non meno di 1 L di campione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45 µm (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici 0,7/0,2 µm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se necessario, per la presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua peptonata (2.5.4.1.). Incubare a (36±1)°C per (16÷20) ore.

2.5.5.2. Estrazione del DNA

Dal brodo di prearricchimento (2.5.4.1.) prelevare 2 mL. Centrifugare il campione a 4.500 g per 20 minuti ed eliminare il supernatante. Risospendere il pellet in 700 µL di Chelex-100 (2.5.4.2.) e 4,5 µL di proteinasi K (2.5.4.3.). Incubare il campione a (55±1)°C per 30 minuti e successivamente a (94±1)°C per 10 minuti. Centrifugare il campione a 6000 g per 5 minuti e utilizzare il supernatante per la successiva PCR.

2.4.5.3. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Il DNA estratto viene utilizzato per una PCR con una coppia di *primer* specifici (2.5.4.5.). Preparare per ogni campione una soluzione (25 µL) contenente 1,5 mM $MgCl_2$, 1x tampone di PCR, 200 µM di dNTP, 0,4 µM di ogni *primer* (2.5.4.5.), 0,75 U di Polimerasi e 5 µL del DNA estratto. Portare al volume finale di 25 µL con acqua distillata sterile. Eseguire la PCR attivando la polimerasi a 95°C per 10 minuti; proseguire con 38 cicli a 95°C per 30 secondi, 64°C per 30 secondi, e 72°C per 30 secondi, con un passaggio finale di estensione a 72°C per 4 minuti.

Miscelare i prodotti della PCR (8 µL per campione) con 4 µL del tampone di caricamento (2.5.4.10.). Introdurre la miscela nei pozzetti del gel ed effettuare la corsa su gel di agarosio (2.5.4.11.).

2.4.5.4. Interpretazione dei risultati

Nella corsa elettroforetica, per considerare il risultato positivo, è necessario rilevare la presenza di una banda corrispondente a 284 pb. La presenza di un amplificato atteso non fornisce indicazioni sul numero di salmonelle presenti. Il metodo ha un limite di sensibilità pari a 3 UFC/L.

Bibliografia di riferimento

American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed. Washington, DC: APHA; 2012.

APAT/IRSA-CNR. *Metodi Analitici per le Acque*. *29/2003.* Roma: APAT/IRSA-CNR; 2003.

Bonetta S, Borelli E, Bonetta S, Conio O, Palumbo F, Carraro E. Development of a PCR protocol for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in surface water. *Environ Monit Assess* 2011;177:493-503.

Collazo CM, and Galan JE. The invasion associated type-III protein secretion system in *Salmonella* – a review. *Gene* 1997;192:51-9.

Malorny B, Hoofar J, Bunge C, and Helmuth R.. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards and international standard. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:290-6.

UNI EN ISO 19250. *Qualità dell'acqua - Ricerca di Salmonella spp.* Geneva: International Organization for Standardization; 2012.

WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella.* Michel Y. Popoff and Léon *Le Minor Formules Antigeniques des Serovars de Salmonella.* Geneve: World Health Organization; 2001.

DETERMINAZIONE DI CISTI DI *GIARDIA* E OOCISTI DI *CRYPTOSPORIDIUM*

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro cisti di *Giardia* e oocisti di *Cryptosporidium* rilevati con i metodi ISS Pi 008A rev. 00 e ISS Pi 008B rev.00.

Ritenuti inizialmente agenti di zoonosi, avendo negli anni più recenti acquisito capacità infettanti più ampie, i due protozoi sono anche riconosciuti come patogeni umani diretti. Nell'acqua di piscina o di ambienti simili la presenza dei due parassiti costituisce una condizione di rischio come documentato da numerose epidemie associate alla frequentazione di piscine riportate soprattutto negli Stati Uniti, nel Regno Unito e in Australia.

Giardia lamblia (o *intestinalis*) è un protozoo flagellato, riconosciuto come patogeno per l'uomo dalla metà degli anni '60. Ha un ciclo monoxeno che comprende lo stadio di trofozoite e quello di cisti, la forma infettante.

Gli organismi appartenenti al genere *Cryptosporidium* sono protozoi coccidi e *C. parvum* è riconosciuto come patogeno per l'uomo dal 1976. Tuttavia, altre specie appartenenti al genere, negli ultimi anni, si sono manifestate come patogeni umani. Anche *Cryptosporidium* ha un ciclo monoxeno, nel quale la riproduzione sessuata e asessuata si compiono nello stesso ospite; attraverso una serie di stadi si produce l'oociste, forma di resistenza nell'ambiente e infettiva nell'uomo e negli animali.

Le cisti di *Giardia* e le oocisti di *Cryptosporidium* vengono introdotte nell'ambiente con le feci dai serbatoi di infezione che possono essere rappresentati dall'uomo, ma anche da numerosi animali selvatici, di allevamento e domestici. La diffusione delle cisti e delle oocisti nell'ambiente è favorita dalla scarsa specificità d'ospite di questi parassiti, nonché dalla notevole resistenza di queste strutture agli stress ambientali e ai trattamenti di potabilizzazione e disinfezione delle acque.

Giardiasi e criptosporidiosi sono patologie a trasmissione fecale-orale, che possono trascorrere in forma asintomatica o determinare una gastroenterite autorisolvente nei soggetti immunocompetenti. Negli immunodepressi, in modo particolare nei malati di AIDS, invece, soprattutto l'infezione da *Cryptosporidium,* può cronicizzare, provocando una diarrea persistente, con conseguenze gravi, che possono arrivare sino alla morte.

Le modalità d'infezione, per entrambi i parassiti, sono rappresentate dal consumo o dall'ingestione involontaria di acqua contaminata, dal consumo di alimenti contaminati, dal contatto interpersonale e con animali che fungono da serbatoi. Tuttavia, l'acqua è stata riconosciuta come il principale veicolo di trasmissione per questi parassiti, la cui presenza è stata rilevata in acque grezze, potabili, superficiali e di piscina.

Le acque di piscina possono essere contaminate dal rilascio accidentale di feci da parte di frequentatori infetti oppure la contaminazione può essere ricondotta anche alla scarsa qualità dell'acqua di approvvigionamento e, nel caso di piscine all'aperto, può derivare dall'apporto di deiezioni fecali di origine animale. È nota, d'altra parte, la resistenza delle cisti e delle oocisti ai trattamenti comunemente attuati nei processi di disinfezione che non riescono quindi a garantire la rimozione dei parassiti da acque contaminate. Questa caratteristica unita alle basse dosi infettanti (*Giardia:* 25 cisti, *Cryptosporidium* 132 oocisti) e all'emissione massiva di cisti/oocisti con le feci (10^6-10^7 cisti/oocisti / g di feci), rendono la loro presenza nell'acqua delle piscine e di ambienti simili una condizione di rischio sanitario.

Di seguito verranno descritti i metodi per la ricerca di cisti e oocisti dei protozoi patogeni, *Giardia* e *Cryptosporidium*, sebbene la loro determinazione non sia specificatamente richiesta dall'Accordo del 2003. La loro ricerca tuttavia si può rendere necessaria qualora occorra effettuare un esame analitico in seguito a casi manifesti di malattia.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS Pi 008A rev. 00 e ISS Pi 008B rev. 00 vengono utilizzate per la determinazione di *Giardia* e *Cryptosporidium* nelle acque di piscina e di piscine naturali.

Possono quindi essere utilizzate per valutare la eventuale presenza di protozoi nell'acqua di approvvigionamento, nell'acqua di immissione in vasca e nell'acqua in vasca, come anche in ambienti simili alle piscine e in piscine naturali.

Sono anche descritte alcune tecniche di conferma molecolare (PCR, RT-PCR).

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo ISS Pi 008A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Metodo di filtrazione su capsula. Il metodo è in linea con la norma ISO 15553. Prevede la filtrazione su capsula, porosità nominale 1 µm, di campioni d'acqua, l'eluizione di cisti e oocisti con una soluzione di lavaggio, la concentrazione e la purificazione dell'eluato tramite centrifugazione e flottazione/immunoseparazione, la determinazione e il conteggio al microscopio delle cisti e oocisti mediante immunofluorescenza diretta.

Inoltre, prove di conferma molecolare possono essere effettuate mediante reazioni di PCR e *nested*-PCR (2.3.), mentre informazioni sullo stato di vitalità possono essere acquisite mediante la reazione di RT-PCR (2.4.).

2.1.2. Strumentazione e vetreria

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

- agitatore con braccetti;
- agitatore ruotante Sample Mixer MX-1 (Dynal);
- apparato di filtrazione per filtri a membrana da 25 mm di diametro;
- camera umida;
- centrifuga refrigerata (a circa +4°C) a rotore basculante per contenitori da 50-250 mL;
- contalitri;
- contenitori da centrifuga da 250 mL con fondo conico o tipo bottiglia;
- contenitori da centrifuga monouso da 50 e 15 mL con fondo conico;
- dispositivo magnetico MPC-1 per provetta L10 con parete piatta (Dynal);
- dispositivo magnetico MPC-S per provette da 1,5 mL (Dynal);
- filtro a capsula in polietersulfone (1 µm di porosità, 6 cm di diametro, 21 cm di lunghezza, 1300 cm^2 di superficie) per volumi inferiori ai 50 litri per acque ricche di solidi sospesi, fino a 200 L per acque con minima quantità di solidi sospesi; filtro a

capsula in poliestere (1 µm di porosità, 6 cm di diametro, 21 cm di lunghezza, 1300 cm^2 di superficie) per volumi fino a 1000 litri di acqua con minima quantità di solidi sospesi;
- filtri a membrana 0,22 µm di porosità;
- membrane di policarbonato, 1,2 µm di porosità, 25 mm di diametro;
- microscopio ad epifluorescenza con filtri per l'FITC (filtri di eccitazione 450-490 nm, filtro barriera 515-520 nm) e per gli UV (filtro di eccitazione 340-380 nm, filtro barriera 420 nm), obiettivi 20, 40 e 100x e oculare con micrometro lineare. È necessario disporre del contrasto di fase e qualora possibile del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- pipette da 1, 10, 25 mL;
- pipettatrice automatica;
- pompa aspirante con portata intorno ai 14 L/minuto;
- provette L10 con parete piatta (Dynal);
- regolatore di flusso;
- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette;
- vetrini a pozzetto (compresi nel kit per l'immunofluorescenza);
- vetrini a pozzetto Spot-on (Dynal);
- vortex.

2.1.3. Volume da campionare

Questo metodo consente di campionare volumi variabili d'acqua (10-1000 L) in relazione alla torbidità, usando eventualmente tipologie diverse di cartucce (polietersulfone oppure poliestere) oppure aumentandone il numero per filtrare il volume appropriato. I campioni di acqua di piscine naturali possono essere di volume inferiore rispetto a quelli prelevati da piscine trattate (oltre 100 L), ma comunque non inferiore ai 50 L.

2.1.4. Reagenti

2.1.4.1. Soluzione di PBS (Phosphate Buffer Saline) 10x

Composizione		
NaCl	80	g
KH_2PO_4	2	g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	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 N o HCl 0,1 N. Sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (121±3)°C.

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

2.1.4.2. Soluzione di PBS 1x

Composizione		
PBS 10x	100	mL
Acqua distillata	900	mL

Mescolare i due componenti.

2.1.4.3. Soluzione di Idrossido di sodio (NaOH) 0,1 N

Composizione		
NaOH	0,4	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere in acqua distillata su agitatore magnetico.

2.1.4.4. Soluzione di Acido cloridrico (HCl) 0,1 N

Composizione		
HCl 37%	0,82	mL
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere in acqua distillata.

2.1.4.5. Tampone per eluizione

Composizione		
Laureth 12	1	g
Tris-HCl 1M, pH 7,4	10	mL
$EDTANa_2$ 0,5 M, pH 8	2	mL
Antischiuma A	150	µL
Acqua distillata sterile		

Pesare il Laureth 12 in un becker di vetro borosilicato e aggiungere 100 mL di acqua distillata sterile. Scaldare su una piastra o in un forno a microonde per consentire al Laureth 12 di sciogliersi. Trasferire la soluzione in un matraccio da 1 L.

Sciacquare il becker numerose volte e mettere l'acqua di risciacquo nel matraccio.

Aggiungere gli altri reattivi. Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata sterile.

2.1.4.6. Tris-HCl 1 M, pH 7,4

Composizione		
Tris	121,1	g
Acqua distillata		

Sciogliere il Tris nell'acqua e portare a pH (7,4±0,2) con HCl o NaOH 0,1 N. Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Sterilizzare attraverso un filtro a membrana da 0,22 µm; conservare in un contenitore di plastica a temperatura ambiente.

2.1.4.7. $EDTANa_2$ 0,5 M, pH 8

Composizione		
$EDTANa_2$ 2 H_2O	186,1	g
Acqua distillata		

Sciogliere l'$EDTANa_2$ nell'acqua e portare a pH (8±0,2) con HCl o NaOH 0,1 N. Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

2.1.4.8. Soluzione di Percoll-Saccarosio 1 (100 mL)

Composizione		
Percoll (densità=1,13)	45	mL
Saccarosio 2,5 M	10	mL
Acqua distillata	45	mL

Mescolare i componenti e controllare che la densità sia tra 1,09-1,1 con un idrometro. Tutta la procedura deve essere svolta mantenendo i reattivi in condizioni refrigerate.

2.1.4.9. Soluzione di Percoll-Saccarosio 2 (30 mL)

Composizione		
Percoll (densità=1,13)	15,9	mL
Saccarosio 2,5 M	14,1	mL

Mescolare i componenti e controllare che la densità sia tra 1,09-1,1 con un idrometro.
Tutta la procedura deve essere svolta mantenendo i reattivi in condizioni refrigerate.

2.1.4.10. Soluzione di Saccarosio 2,5 M

Composizione		
Saccarosio	855,8	g
Acqua distillata	400	mL

Far sciogliere il saccarosio nell'acqua distillata preriscaldata. Raffreddare e portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

2.1.4.11. Soluzione di lavaggio A

Composizione		
PBS 10x	100	mL
Tween-80	1	mL
Sodio Dodecil Solfato (SDS)	1	g
Antischiuma B	500	µL
Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

2.1.4.12. Soluzione di lavaggio B

Composizione		
PBS 10x	100	mL
Tween-20	0,5	mL
Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

2.1.4.13. Kit per immunoseparazione (Dynal)

Componenti
Soluzione di microsfere (dynabeads) coniugate con anticorpi anti-*Cryptosporidium*;
Soluzione di microsfere (dynabeads) coniugate con anticorpi anti-*Giardia*;
Tampone A 10x SL™;
Tampone B 10x SL™.

Conservare i componenti a (5±3)°C.

2.1.4.14. Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta

Componenti
Anticorpi monoclonali anti-*Cryptosporidium* coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina;
Anticorpi monoclonali anti-*Giardia* coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina;
Controllo positivo;
Controllo negativo;
Tampone di lavaggio;
Soluzione di montaggio (Mounting Medium).

Conservare i componenti a (5±3)°C, protetti dalla luce.

2.1.4.15. Soluzione stock DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole)

Composizione		
DAPI	2	mg
Metanolo	1	mL

Poiché la soluzione si conserva al buio a (5±3)°C per due settimane, è opportuno preparare il volume minimo di soluzione necessario per l'uso.

2.1.4.16. Soluzione di colorazione DAPI - PBS (0,4 µg DAPI/mL PBS)

Composizione		
Soluzione stock DAPI	10	µL
PBS 1x	50	mL

Mescolare i componenti

2.1.4.17. Tampone di pre-trattamento

Composizione		
Sodio polifosfato	5	g
Acqua distillata	1000	mL

Dissolvere la polvere di sodio polifosfato nell'acqua distillata. La soluzione si conserva a (5±3)°C o a temperatura ambiente per una settimana e si utilizza a (20±5)°C.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Campionamento

Il campionamento può essere effettuato ponendo la pompa e il regolatore di flusso a monte della capsula e il contalitri a valle di questa; si può anche utilizzare un sistema in pressione (rubinetto). Il flusso deve essere intorno a 2 L/minuto. Prima di iniziare il campionamento e montare quindi la capsula, è importante far passare attraverso il sistema dai 100 ai 200 L di acqua. Inserire poi la capsula dopo aver rimosso e tenuto da parte i tappi che proteggono le due estremità della capsula.

Dopo aver avviato la pompa aprire la valvola di sfiato della capsula girandola in senso orario, permettendo così all'aria di uscire dalla capsula. Effettuare il campionamento.

Quando tutto il campione è stato raccolto, rimuovere l'entrata del tubo dalla fonte d'acqua e consentire alla pompa di pompare il resto dell'acqua rimasta nel tubo dentro la capsula. Staccare il tubo di uscita e tappare l'estremità di uscita della capsula, quindi staccare l'altra estremità facendo attenzione a non perdere l'acqua rimasta nella capsula e tapparla. In ogni caso, il campionamento deve considerarsi concluso quando il flusso risulta ridotto in conseguenza dell'intasamento della capsula. Trasportare la capsula in condizioni refrigerate in laboratorio.

2.1.5.2. Eluizione della capsula

Se l'acqua rimasta nella capsula riempie meno della metà della cartuccia, mantenerla nella cartuccia e procedere con l'eluizione. Se l'acqua rimasta nella capsula riempie più della metà della cartuccia, svuotarla in un contenitore e tenerla da parte come parte del campione.

Per la capsula in polietersulfone, aggiungere 120 mL di tampone per eluizione (2.1.4.5.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 12 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 cpm (cicli per minuto). Tenendo la cartuccia in posizione verticale, rimuovere il tappino dall'estremità inferiore e raccogliere il liquido di pre-lavaggio in un tubo da centrifuga.

Aggiungere altri 120 mL di tampone per eluizione (2.1.4.5.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 9 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 cpm. Raccogliere l'eluato in un tubo da centrifuga come sopra indicato.

Miscelare l'eluato con il precedente e aggiungere l'eventuale residuo d'acqua tenuto da parte.

Centrifugare a 1100 × g per 10 minuti, decelerare lentamente senza usare il freno. Eliminare con attenzione il surnatante. Misurare il volume del campione concentrato.

Per la capsula in poliestere, aggiungere 120 mL di tampone di pre-trattamento (2.1.4.17.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 12 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 cpm. Tenendo la cartuccia in posizione verticale, rimuovere il tappino dall'estremità inferiore e raccogliere il liquido di pre-lavaggio in un tubo da centrifuga. Chiudere l'estremità inferiore della capsula; riempire la capsula con 120 mL di acqua distillata sterile attraverso l'estremità di entrata, chiuderla e ruotarla delicatamente per trenta secondi. Raccogliere l'eluato in un tubo da centrifuga come sopra indicato.

Aggiungere 120 mL di tampone per eluizione (2.1.4.5.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 12 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 cpm. Tenendo la cartuccia in posizione verticale, rimuovere il tappino dall'estremità inferiore e raccogliere il liquido di pre-lavaggio in un tubo da centrifuga.

Aggiungere altri 120 mL di tampone per eluizione (2.1.4.5.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 4 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 cpm. Senza rimuovere la capsula dall'agitatore, ruotarla in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 8 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 cpm. Raccogliere l'eluato in un tubo da centrifuga come sopra indicato.

Miscelare gli eluati ottenuti dai vari lavaggi e aggiungere l'eventuale residuo d'acqua tenuto da parte.

Centrifugare a 1100 × g per 10 minuti, decelerare lentamente senza usare il freno. Eliminare con delicatezza il surnatante. Misurare il volume del campione concentrato.

Qualora il procedimento di concentrazione avesse portato ad un campione finale di eccessiva torbidità per l'analisi diretta mediante immunofluorescenza, si procede alla chiarificazione del campione.

2.1.5.3. Chiarificazione

- ***Chiarificazione mediante flottazione su cuscino di Percoll-Saccarosio***

  Preparare 30 mL di soluzione Percoll-Saccarosio per ogni campione. Questa soluzione può essere preparata secondo due metodi diversi.
  Utilizzare la soluzione di Percoll-Saccarosio 1 (2.1.4.8.) e procedere nel seguente modo.
  Prendere 0,5 mL di campione concentrato (dal volume totale di 1-50 mL) e aggiungere 19,5 mL di soluzione di lavaggio A (2.1.4.11.) utilizzata per eluire la cartuccia. Mettere, in una provetta da 50 mL, 20 mL di campione e iniettare sul fondo 30 mL di soluzione di Percoll-Saccarosio 1, facendo attenzione a non rompere l'interfaccia tra le due componenti.
  Utilizzare la soluzione di Percoll-Saccarosio 2 (2.1.4.9.) e procedere nel seguente modo.
  Prendere 1 mL di campione concentrato dal volume finale (1-50 mL) e aggiungere 19 mL di soluzione di lavaggio A (2.1.4.11.) utilizzata inizialmente per eluire la cartuccia. Mettere la soluzione di Percoll-Saccarosio 2 (30 mL) in una provetta da 50 mL e stratificare sulla superficie 20 mL di campione.
  In entrambi i casi centrifugare a 1050 × g per 10 minuti a (5±3)°C accelerando lentamente e senza usare il freno alla fine della centrifugazione.
  Prelevare con cura il supernatante, l'interfaccia e circa 5 mL di Percoll-Saccarosio (per un totale di circa 25 mL) e raccoglierlo in una provetta da 50 mL.
  Introdurre nella provetta contenente il campione chiarificato la soluzione di lavaggio B (2.1.4.12.) fino a raggiungere il volume di 50 mL, mescolare con vortex e centrifugare a 1050 × g per 15 minuti.
  Aspirare il supernatante e raccogliere il pellet (1-5 mL).
  È opportuno includere tra i campioni da sottoporre a purificazione alcuni controlli positivi a concentrazione nota di cisti e oocisti, che, processati contemporaneamente, consentono di valutare l'efficienza di recupero del metodo.

- ***Chiarificazione mediante separazione immunomagnetica***

  La metodica prevede che le cisti di *Giardia* e le oocisti di *Cryptosporidium* siano isolate da campioni concentrati di acqua mediante l'utilizzo di microsfere uniformi, monodisperse, superparamagnetiche, coniugate covalentemente con anticorpi anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* (2.1.4.13.). I complessi microsfere-cisti/oocisti vengono separati mediante l'applicazione di un campo magnetico; le cisti/oocisti vengono successivamente dissociate dalle microsfere così da ottenere un volume ridotto di una sospensione finale limpida da analizzare mediante immunofluorescenza diretta.

L'efficienza di recupero di cisti e oocisti varia dal 60 al 95% se, relativamente al particolato presente nell'acqua, sono rispettati i limiti indicati. È inoltre opportuno includere tra i campioni da sottoporre a purificazione alcuni controlli positivi a concentrazione nota di cisti e oocisti, che, processati contemporaneamente, consentono di valutare l'efficienza di recupero del metodo.
La quantità di materiale particolato presente in 10 mL di campione concentrato deve essere inferiore a 0,5 mL, altrimenti il campione deve essere diluito e diviso in più aliquote prima di procedere alla chiarificazione.
Trasferire 10 mL di campione in un'apposita provetta con parete piatta e aggiungere 1mL di tampone A 10x SL^{TM} (2.1.4.13.), 1 mL di tampone B 10x SL^{TM} (2.1.4.13.), 100 µL della sospensione di microsfere anti-*Cryptosporidium* (2.1.4.13.) e 100 µL della sospensione di microsfere anti-*Giardia* (2.1.4.13.) (le sospensioni di microsfere devono essere agitate vigorosamente mediante vortex immediatamente prima di essere usate). Incubare il campione in agitazione-rotazione nell'agitatore ruotante Sample Mixer MX-1 a 18 rpm, a temperatura ambiente per un'ora. Inserire la provetta nel dispositivo MPC-1 con la parete piatta rivolta verso il magnete e ruotare il dispositivo manualmente e delicatamente in modo da effettuare una rotazione di 90° ogni secondo per la durata di due minuti. Durante questa fase i complessi microsfere-cisti e oocisti aderiscono alla parete della provetta esposta al magnete. Senza rimuovere la provetta dal dispositivo, eliminare il supernatante capovolgendo il dispositivo stesso. Togliere la provetta dal dispositivo magnetico e risospendere il campione in 1 mL di tampone A 1x. Trasferire la soluzione in una provetta da 1,5 mL e inserire quest'ultima nell'apposito dispositivo MPC-S con la parete magnetica inserita. Agitare manualmente il campione ruotando il dispositivo in modo da compiere un movimento di 90° al secondo per la durata di un minuto. Aspirare immediatamente il supernatante, facendo attenzione a non rimuovere anche i complessi microsfere cisti/oocisti. Rimuovere la barra magnetica e risospendere il campione in 100 µL di HCl 0,1 N; agitare per 5 secondi mediante vortex e lasciare riposare a temperatura ambiente per 10 minuti nel portaprovette MPC-M (senza parete magnetica). Dopo ulteriore agitazione mediante vortex per 5 secondi, reinserire i campioni nel portaprovette MPC-M, reintrodurre la parete magnetica nel dispositivo stesso e attendere 10 secondi. Senza togliere la provetta dal dispositivo magnetico, prelevare 50µL di supernatante e trasferli su un vetrino a pozzetto Dynal Spot-on su cui sono stati posti 5 µL di NaOH 1 N. Il vetrino è lasciato all'aria ad asciugare e, una volta asciutto, il campione è fissato depositando nel pozzetto 50 µL di metanolo e lasciando evaporare all'aria. Si procede quindi alla identificazione per immunofluorescenza diretta (2.1.5.3.).
Trasferire i rimanenti 50 µL in una provetta da 1,5 mL e aggiungere 5 µL di NaOH 1 N. Questa aliquota di campione potrà essere utilizzata qualora si ritenga opportuno procedere a prove di conferma molecolare mediante PCR, oppure potrà essere analizzata per immunofluorescenza in un secondo tempo.

2.1.5.4. Determinazione mediante immunofluorescenza diretta

Il principio si basa sull'uso di anticorpi monoclonali di topo anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* coniugati con FITC che si legano ad antigeni presenti sulle pareti.

- ***Procedimento su vetrino***

  Portare i reattivi del kit (2.1.4.14.) a temperatura ambiente. Trasferire 10-50 µL di campione in un pozzetto del vetrino. Trasferire 10 µL del controllo positivo in un pozzetto e 10 µL del controllo negativo in un altro. Asciugare a temperatura ambiente o più rapidamente in stufa a (36±1)°C. Fissare ciascun campione secondo le modalità indicate dalla ditta produttrice del kit. Mettere 20-50 µL di anticorpo su ciascun pozzetto e incubare

il vetrino in camera umida, al buio, a temperatura ambiente per 30 minuti. Aspirare l'eccesso di anticorpo con una pompa Venturi usando una pipetta con punta molto fine. Lavare il vetrino con molta cautela usando il tampone di lavaggio fornito dal kit o PBS 1x. Porre 100 µL della soluzione di colorazione DAPI-PBS (2.1.4.16.) nel pozzetto e lasciare incubare a (36±1)°C al buio per 15 minuti. Eseguire altri due lavaggi con PBS 1x (2.1.4.2.) e acqua distillata. Asciugare il vetrino a (36±1)°C. Montare il vetrino coprioggetto con una goccia di soluzione di montaggio, facendo attenzione a non formare bolle.

- ***Procedimento su filtro***

  Portare tutti i reattivi del kit (2.1.4.14.) a temperatura ambiente. Preparare la membrana (porosità 1,2 µm, in policarbonato, di diametro 25 mm) bagnandola con PBS 1x; porre la membrana sul supporto di filtrazione. Filtrare 1 mL di campione. Evitare che il campione posto sulla membrana vada a secco durante tutti i passaggi.
  Aggiungere una goccia di anticorpi fluoresceinati. Incubare a (36±1)°C per 30 minuti. Filtrare, quindi lavare una volta la membrana con PBS 1x (2.1.4.2.) aggiungendone 3 mL e filtrando. Successivamente porre 100 µL della soluzione di colorazione del DAPI (2.1.4.16.) e lasciare incubare a (36±1)°C per 15 minuti. Effettuare altri 2 lavaggi con PBS 1x (2.1.4.2.). Eliminare ogni traccia di liquido mediante filtrazione.
  Porre una goccia di liquido di montaggio su un vetrino, farvi aderire la membrana, quindi montare il vetrino coprioggetto con il liquido di montaggio.

2.1.5.5. Esame microscopico

Osservare al microscopio tutto il vetrino a 200 o 400 ingrandimenti con il microscopio ad epifluorescenza e individuare le strutture fluorescenti verde mela con forma e dimensioni caratteristiche delle cisti di *Giardia* (lunghezza 8 - 12 µm e larghezza 7 - 10 µm) e delle oocisti di *Cryptosporidium* (diametro 3,5 - 6,5 µm), utilizzando un micrometro lineare ed effettuando dei confronti con un controllo positivo. Segnare le coordinate del vetrino dove sono state rinvenute le cisti e le oocisti. Questa valutazione consente di fornire una determinazione presuntiva delle cisti e delle oocisti.

Effettuare l'osservazione delle stesse strutture in epifluorescenza a 1000 ingrandimenti in immersione, quindi passare sull'obiettivo con il contrasto di fase o con il contrasto ad interferenza differenziale (DIC). Con il contrasto di fase è possibile distinguere le cisti e oocisti piene da quelle vuote e, quindi, dare un'ulteriore indicazione sulla presunta vitalità di cisti e oocisti piene. Con il microscopio a contrasto interferenziale è invece possibile valutare la presenza di strutture interne (nuclei, corpi mediani, spazio peritrofico nella *Giardia*; sporozoiti e granuli residui nel *Cryptosporidium*), valutazioni che consentono sia di confermare la determinazione, sia di dare una ulteriore indicazione in merito alla condizione delle cisti e delle oocisti: si possono distinguere, infatti, cisti e oocisti vuote, contenenti strutture amorfe oppure contenenti strutture caratteristiche ben conservate.

Effettuata questa valutazione, registrare il numero totale di cisti di *Giardia* e di oocisti di *Cryptosporidium.*

Se è stata effettuata anche la valutazione con il contrasto di fase annotare il numero di cisti e oocisti che risultano piene o vuote.

Se è stata effettuata anche la valutazione con il DIC annotare il numero di cisti e oocisti vuote, con contenuto amorfo o con strutture interne.

Per effettuare le valutazioni al contrasto di fase o con il DIC è consigliabile utilizzare la tecnica di immunofluorescenza su vetrino a pozzetto perché questa condizione consente una maggiore trasparenza.

Per effettuare la valutazione di vitalità mediante la colorazione con il DAPI è consigliabile effettuare la lettura con l'obbiettivo 100 × e l'apposito filtro ad UV. Vengono considerate vitali le cisti e le oocisti contenenti nuclei colorati in blu.

2.1.5.6. Interpretazione dei risultati

Ogni campione che presenta una o più strutture tipiche assimilabili a cisti di *Giardia* o oocisti di *Cryptosporidium* per fluorescenza, forma e dimensioni può essere considerato presuntivamente un campione positivo.

2.1.5.7. Interferenze e cause di errore

La torbidità, il particolato organico e inorganico del campione d'acqua possono interferire con il recupero delle cisti e oocisti nella fase di concentrazione e purificazione e con la determinazione delle strutture al microscopio.

Organismi (alghe e lieviti) e detriti autofluorescenti possono interferire durante la determinazione al microscopio a epifluorescenza e causare la registrazione di falsi positivi.

Le sostanze utilizzate nella disinfezione possono determinare delle interferenze nella individuazione delle strutture interne alle cisti e oocisti perché possono causarne la parziale distruzione o trasformazione in strutture amorfe e pertanto irriconoscibili.

2.1.5.8. Espressione dei risultati

Il numero totale di cisti e oocisti contate sull'intera superficie di ciascun pozzetto si riferisce al volume di campione ivi deposto. Tale numero deve essere rapportato al volume totale di supernatante derivante dalla chiarificazione e al volume di eluato sottoposto a chiarificazione; tale numero viene quindi rapportato al volume totale del campione eluato e infine rapportato al numero di litri di campione filtrati. Riportare comunque il risultato come n./100 L.

2.1.6. Efficienza di recupero del metodo

Per campioni di acqua di piscina trattata, se si utilizzano capsule filtranti in polietersulfone, l'efficienza di recupero del metodo prima della fase di chiarificazione varia dal 20 al 35% per *Cryptosporidium* e dal 45 al 95% per *Giardia*. Se si utilizzano capsule filtranti in poliestere, l'efficienza di recupero del metodo per *Cryptosporidium* varia dal 33 al 79%, prima della fase di chiarificazione.

2.2. Metodo ISS Pi 008B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Metodo di filtrazione su dischi. Il metodo è in linea con la norma ISO 15553. Si basa sulla filtrazione di volumi noti di acqua, attraverso filtri costituiti da dischi di schiuma compressa, sulla eluizione dei dischi stessi mediante ripetuti movimenti di compressione e decompressione in un tampone eluente e sulla concentrazione dell'eluato mediante aspirazione con pompa da vuoto. Il concentrato è successivamente sottoposto a chiarificazione mediante flottazione su cuscino di saccarosio o mediante immunoseparazione. Il rilevamento delle cisti di *Giardia* e delle oocisti di *Cryptosporidium* avviene per analisi microscopica del campione mediante immunofluorescenza diretta.

Inoltre, prove di conferma molecolare possono essere effettuate mediante reazioni di PCR e *nested*-PCR (2.3.), mentre informazioni sullo stato di vitalità possono essere acquisite mediante la reazione di RT-PCR (2.4.).

2.2.2. Strumentazione e vetreria

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

- agitatore ruotante Sample Mixer MX-1 (Dynal);
- apparato di filtrazione per filtri a membrana da 25 mm di diametro;
- camera umida;
- dispositivo magnetico MPC-1 per provetta L10 con parete piatta (Dynal);
- dispositivo magnetico MPC-S per provette da 1,5 mL (Dynal);
- Filta-Max Automatic Wash Station (IDEXX) completa di equipaggiamento (alloggiamento per il filtro, macchina, stantuffo, tubo di eluizione, tubo di concentrazione, base del tubo di concentrazione, coperchio con barra magnetica, chiave di Allen, tubo di acciaio, tappini di gomma, bustine di nylon, guarnizioni O-ring);
- membrane di nitrato di cellulosa, 73 mm di diametro, 3 µm di porosità (IDEXX);
- membrane di policarbonato, 1,2 µm di porosità, 25 mm di diametro;
- microscopio ad epifluorescenza con filtri per l'FITC (filtri di eccitazione 450-490 nm, filtro barriera 515-520 nm) e per gli UV (filtro di eccitazione 340-380 nm, filtro barriera 420 nm), obiettivi 20, 40 e 100x e oculare con micrometro lineare. È necessario disporre del contrasto di fase e qualora possibile del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- moduli filtranti Filta- Max (dischi di schiuma compressa, IDEXX), porosità nominale 1 µm;
- piastra magnetica;
- pinzette;
- pompa da vuoto manuale
- pompa aspirante con portata intorno ai 14 L/minuto;
- provette L10 con parete piatta (Dynal);
- regolatore di flusso;
- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette;
- vetrini a pozzetto (compresi nel kit per l'immunofluorescenza);
- vetrini a pozzetto Spot-on (Dynal);
- vortex.

2.2.3. Volume da campionare

I volumi di acqua da campionare mediante filtrazione possono essere variabili (comunque non meno di 100 L) in relazione alla loro origine e alla loro torbidità. Se la quantità di solidi sospesi è molto bassa, il metodo consente di filtrare fino a 1000 litri di acqua (piscine trattate), concentrando il campione ad un volume finale di circa 25 mL.

I volumi di acqua da campionare per le piscine naturali saranno presumibilmente inferiori e comunque non inferiori a 50 L.

2.2.4. Reagenti

2.2.4.1. Soluzione di Phosphatase Buffer Saline - Tween 20 10x (PBST 10x)

Composizione		
NaCl	80	g
KH_2PO_4	2	g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	29	g
KCl	2	g
Tween 20	100	µL
Acqua distillata		

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

2.2.4.2. Soluzione di Phosphatase Buffer Saline - Tween 20 1x (PBST 1X)

Composizione		
Soluz. di PBS - Tween 20 10x	100	mL
Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (121±3)°C.

2.2.4.3. Soluzione di Percoll-Saccarosio 1 (100 mL) (*vedi* 2.1.4.8.)

2.2.4.4. Soluzione di Percoll-Saccarosio 2 (30 mL) (*vedi* 2.1.4.9.)

2.2.4.5. Soluzione di Saccarosio 2,5 M (*vedi* 2.1.4.10.)

2.2.4.6. Soluzione di lavaggio A (*vedi* 2.1.4.11.)

2.2.4.7. Soluzione di lavaggio B (*vedi* 2.1.4.12.)

2.2.4.8. Kit per immunoseparazione (Dynal) (*vedi* 2.1.4.13.)

2.2.4.9. Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta (*vedi* 2.1.4.14.)

2.2.4.10. Soluzione stock DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) (*vedi* 2.1.4.15.)

2.2.4.11.Soluzione di colorazione DAPI-PBS (0,4 µg DAPI/mL PBS) (*vedi* 2.1.4.16)

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Campionamento e volume da analizzare

Posizionare il modulo filtrante Filta-Max nel suo alloggiamento di filtrazione con la vite rivolta verso il coperchio. Avvitare il coperchio. Collegare l'estremità di entrata dell'alloggiamento di filtrazione all'estremità di uscita della pompa in modo che il flusso sia rivolto dal coperchio all'estremità opposta dell'alloggiamento. Collegare l'estremità di uscita di quest'ultimo al contalitri. È richiesta una pressione di circa 5 bar per produrre il massimo flusso consentito pari a 3-4/L al minuto e, in ogni caso la pressione non deve mai eccedere il valore di 8 bar. Una volta completata la procedura di filtrazione, tappare le estremità dell'alloggiamento di filtrazione con gli appositi tappini e trasportare in laboratorio in condizioni refrigerate.

2.2.5.2. Eluizione del filtro

- ***Primo lavaggio***

  Rimuovere il modulo filtrante dalla camera di alloggiamento, conservare l'acqua residua eventualmente contenuta come parte del campione e procedere al risciacquo della camera stessa; unire l'acqua di risciacquo a quella residua.

  Porre una membrana di 73 mm di diametro e 3 µm di porosità sulla base del tubo di concentrazione con il lato rugoso rivolto all'insù. Avvitare il tubo di concentrazione alla

sua base e versarvi l'eventuale campione residuo e il liquido di risciacquo della camera di alloggiamento.
Applicare del silicone lubrificante sulla guarnizione O-ring posta all'esterno dello stantuffo (plunger) nel dispositivo Wash Station. Accendere la Wash Station. Premere F1 per posizionare lo stantuffo nella posizione di partenza. Avvitare il modulo filtrante all'estremità dello stantuffo mediante l'apposita vite. Far scorrere il tubo di eluizione attorno allo stantuffo e fissarne la base alle apposite ganasce sulla Wash Station.
Premere il tasto F1 per abbassare lo stantuffo. Inserire la chiave di Allen nel foro posto sotto la base del tubo di eluizione e rimuovere la vite dal modulo filtrante. Avvitare il tubo di acciaio (senza il tappino di gomma) alla base del tubo di eluizione. Versare 600 mL di PBST 1x (2.2.4.2.) nel tubo di concentrazione assemblato alla sua base e posizionarlo al di sotto del tubo di eluizione utilizzando l'apposita ganascia. Premere il tasto F1 per il prelavaggio. Premere il tasto F3 per il primo lavaggio (lo stantuffo effettua 20 movimenti verticali di compressione e decompressione del filtro). Staccare il tubo di concentrazione assemblato alla sua base dalle ganasce e tenerlo con le mani al di sotto del tubo di acciaio per consentire la procedura di scolo (spurgo). Premere il tasto F4 per la procedura di scolo. Chiudere l'estremità del tubo di acciaio con il tappino di gomma.

- ***Prima fase di concentrazione***

  Chiudere il tubo di concentrazione assemblato alla sua base con il coperchio dotato di barra magnetica e posizionarlo su una piastra magnetica. Connettere il tubo di concentrazione ad una pompa da vuoto manuale per ridurre la fase liquida e ad una bottiglia di plastica usata come trappola. Aprire il rubinetto alla base del tubo di concentrazione e azionare la pompa evitando di superare una pressione di 30 mm di Hg. Aspirare il liquido evitando che la membrana vada a secco. Le cisti e le oocisti dovrebbero rimanere sospese nel liquido al di sopra della membrana la cui funzione è quella di consentire la riduzione del volume d'acqua. Staccare la pompa, rimuovere il coperchio con la barra magnetica e sciacquare la barra con acqua distillata, scolandola nel tubo concentrazione. Travasare il liquido concentrato in una provetta da 50 mL. Sciacquare il tubo di concentrazione con acqua distillata e aggiungerla nella provetta. Con l'ausilio di pinzette, togliere la membrana dalla base del tubo di concentrazione e conservarla nell'apposita bustina di nylon. Qualora per l'elevata torbidità del campione, non fosse possibile concentrare il liquido mediante utilizzo di una sola membrana, procedere alla sostituzione di questa con altre membrane conservando ciascuna in una bustina (nel caso specifico le membrane possono essere posizionate nella base del tubo di concentrazione con il lato liscio all'insù).

- ***Secondo lavaggio***

  Togliere il tappino dall'estremità del tubo di acciaio, versare 600 mL di PBST 1x (2.2.4.2.) nel tubo di concentrazione e posizionare questo al di sotto del tubo di eluizione utilizzando l'apposita ganascia.
  Premere il tasto F3 per il secondo lavaggio (lo stantuffo effettua 10 movimenti verticali di compressione e decompressione del filtro). Staccare il tubo di concentrazione assemblato alla sua base dalle ganasce e tenerlo con le mani al di sotto del tubo di acciaio per consentire la procedura di scolo (spurgo). Premere il tasto F4 per la procedura di scolo. Chiudere l'estremità del tubo di acciaio con il tappino di gomma. Aggiungere il campione concentrato derivante dal primo lavaggio ai 600 mL di eluato provenienti dal secondo.

- ***Seconda fase di concentrazione***

  Chiudere nuovamente il tubo di concentrazione assemblato alla sua base con il coperchio dotato di barra magnetica, posizionarlo sulla piastra magnetica e sottoporre ad agitazione.

Connettere il tubo di concentrazione alla pompa da vuoto e alla bottiglia di plastica usata come trappola e procedere come descritto sopra per la prima fase di concentrazione. Non rimuovere completamente tutto il liquido ma arrestare il processo di concentrazione quando il livello del liquido nel tubo di concentrazione è tale che il magnete sia per metà ancora immerso nel liquido stesso.
Staccare la pompa, rimuovere il coperchio con la barra magnetica e sciacquare la barra con acqua distillata, scolandola nel tubo di concentrazione. Travasare il liquido concentrato in una provetta da 50 mL. Sciacquare il tubo di concentrazione con acqua distillata e aggiungerla nella provetta. Con l'ausilio di pinzette, togliere la membrana dalla base del tubo di concentrazione e conservarla in una bustina di nylon.
Aggiungere 5 mL di PBST 1x (2.2.4.2.) in una delle bustine contenenti le membrane e, mantenendola chiusa, strofinare la superficie facendola scorrere tra le dita per circa un minuto. Con una pipetta rimuovere il liquido e aggiungerlo nella provetta contenente il campione concentrato. Trasferire le altre membrane, una alla volta, nella bustina in cui era contenuta la prima e procedere alla loro eluizione con le stesse modalità. Complessivamente il volume del liquido concentrato dovrebbe essere pari a circa 20-30 mL. Procedere con la fase di chiarificazione (2.1.5.3.).

2.2.5.3. Chiarificazione (*vedi* 2.1.5.3.)

2.2.5.4. Determinazione mediante immunofluorescenza diretta (*vedi* 2.1.5.4.)

2.2.5.5. Esame microscopico (*vedi* 2.1.5.5.)

2.2.5.6. Interpretazione dei risultati (*vedi* 2.1.5.6.)

2.2.5.7.Interferenze e cause d'errore (*vedi* 2.1.5.7)

2.2.5.8. Espressione dei risultati (*vedi* 2.1.5.8.)

2.2.6. Efficienza di recupero del metodo

Per campioni di acqua di piscina trattata, l'efficienza di recupero del metodo prima della fase di chiarificazione varia dal 60 al 90% per entrambi i parassiti.

3. Test di biologia molecolare

3.1. Metodo per PCR e *nested*-PCR

3.1.1. Principio del metodo

Metodi molecolari. Viene verificata la presenza di DNA specifico per *Cryptosporidium parvum* e *Giardia* spp. estraendo il DNA e amplificando mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) con *primer* specifici. Per *Cryptosporidium parvum* è possibile aumentare la sensibilità del metodo effettuando una ulteriore PCR (*nested*-PCR) in cui vengono utilizzati *primer* in grado di appaiarsi all'interno della sequenza amplificata, aumentando in tal modo il segnale ottenuto nel gel di agarosio.

3.1.2. Strumentazione e vetreria

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

- apparecchio per corsa elettroforetica;
- bagnomaria termostatato;
- generatore di corrente;
- termociclatore;
- transilluminatore;
- vaschetta per gel.

3.1.3. Reagenti

3.1.3.1. Tampone di lisi (100 mL)

Composizione		
NaCl 1 M	12	mL
Tris-HCl 1M	2,5	mL
$EDTANa_2$ 100 mM, pH 8	10	mL
SDS 10% (3.1.3.5.)	10	mL
Acqua distillata		

Portare la soluzione composta da NaCl, Tris-HCl ed $EDTANa_2$ ad un volume di 90 mL con acqua distillata e autoclavare a (121±3)°C per (15±1) minuti. Lasciare raffreddare e aggiungere l'SDS.

3.1.3.2. NaCl 1 M (250 mL)

Composizione		
NaCl	14,61	g
Acqua distillata		

Sciogliere il sale nell'acqua distillata e portare al volume finale di 250 mL.

3.1.3.3. Tris-HCl 1 M (250 mL)

Composizione		
Tris	30,29	mL
Acqua distillata		

Sciogliere il Tris in 200 mL di acqua distillata e portare a pH (7±0,2) con HCl 0,1N. Portare a volume finale di 250 mL con acqua distillata.

3.1.3.4. $EDTANa_2$ 100 mM, pH 8 (250 mL)

Composizione		
$EDTANa_2 \cdot 2H_2O$	9,3	g
Acqua distillata		

Sciogliere l'EDTA in 200 mL di acqua distillata e portare a pH (8±0,2) con NaOH 0,1 N. Portare a volume finale di 250 mL con acqua distillata.

3.1.3.5. Soluzione SDS 10% (100 mL)

Composizione	
SDS	10 g
Acqua distillata	

Sciogliere l'SDS in acqua distillata, sotto cappa chimica. Nella preparazione indossare guanti ed evitare l'inalazione.

3.1.3.6. Soluzione stock di proteinasi K

Composizione
Proteinasi K
Acqua distillata

Risospendere l'enzima liofilizzato in un volume noto di acqua distillata a concentrazione di 5000 μg/500 μL e lasciare tutta la notte la soluzione a (5±3)°C.

3.1.3.7. Kit per estrazione del DNA (Qiagen)

Composizione
Colonne di purificazione del DNA;
Tampone di preparazione;
Tampone di lavaggio;
Tampone di eluizione.

Conservare a (-20±1)°C.

3.1.3.8. Kit per PCR

Composizione
Soluzione di $MgCl_2$;
Tampone di PCR;
Oligonucleotidi (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);
Polimerasi.

3.1.3.9. *Primer* per PCR

***Primer* per *Cryptosporidium*:**
CHSP1: 5'-AGCAATCCTCTGCCGTACAGG-3'
CHSP4: 5'-AGAGCATCCTTGATCTTCT-3'
***Primer* per *Giardia*:**
GGL: 5'-AAGTGCGTCAACGAGCAGCT-3'
GGR: 5'-TTAGTGCTTTGTGACCATCGA-3'

Risospendere i *primer* liofilizzati in acqua deionizzata sterile in modo tale da ottenere una soluzione 100 μM. Agitare la soluzione mediante vortex per qualche minuto e tenere a (5±3)°C tutta la notte. La concentrazione dei *primer* può essere verificata allo spettrofotometro. La lettura viene eseguita a 260 nm. Conservare a (–20±1)°C.

3.1.3.10. *Primer* per *nested*-PCR

***Primer* per Cryptosporidium parvum:**
CPHSP2511: 5'-ATGACCAAGCTTATTGAAC-3'
CPHSP2769: 5'-GTGATCTTGCTGCTCTTACCA-3'

Risospendere i *primer* liofilizzati in acqua deionizzata sterile in modo tale da ottenere una soluzione 100 µM. Agitare la soluzione mediante vortex per qualche minuto e tenere a (5±3)°C tutta la notte. La concentrazione dei *primer* può essere verificata allo spettrofotometro. La lettura viene eseguita a 260 nm. Conservare a (–20±1)°C.

3.1.3.11. Soluzione stock di Bromuro di etidio

Composizione		
Bromuro di etidio	100	mg
Acqua distillata	10	mL

Sciogliere su agitatore magnetico il bromuro di etidio in polvere in acqua deionizzata sterile. Trasferire la soluzione così ottenuta in provette da 1,5 mL e conservare al buio a (5±3)°C.

Il bromuro di etidio è mutageno e può provocare alterazioni genetiche ereditarie. È irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. Nocivo per ingestione. Altamente tossico per inalazione. Usare sotto cappa e con DPI. Il prodotto non deve essere smaltito in fogna. In sostituzione sono disponibili in commercio intercalanti del DNA di tipo diverso con minori indicazioni di rischio per la salute (es. gel-red).

3.1.3.12. Gel di agarosio 2% (100 mL)

Composizione		
Agarosio	2	g
TAE 1x	100	mL
Bromuro di etidio	5	µL

Sciogliere l'agarosio nel TAE 1x (3.1.3.14.) scaldando leggermente fino a completa dissoluzione della polvere. Aggiungere il bromuro di etidio e mescolare. Versare la soluzione nello stampo per il gel, posizionare lo spaziatore e attendere fino a completa solidificazione. Togliere lo spaziatore e porre il gel nella vaschetta per corsa elettroforetica riempita con TAE 1x (3.1.3.14.). Effettuare la corsa a 70 V per 1 ora. Osservare il gel al transilluminatore.

3.1.3.13. Soluzione TAE 50x (100mL)

Composizione		
Tris	24,2	g
$EDTANa_2$ 0,5 M, pH 8	10	mL
Acido acetico glaciale	5,7	mL
Acqua distillata		

Sciogliere il Tris in 60 mL di acqua distillata, aggiungere $EDTANa_2$ e acido acetico glaciale. Portare a volume finale di 100 mL con acqua distillata, filtrare e sterilizzare a (121±3)°C per cica 15 minuti.

3.1.3.14. Soluzione di TAE 1 x

Composizione		
TAE 50x	20	mL
Acqua distillata	980	mL

Mescolare i due componenti.

3.1.3.15. EDTA Na_2 0,5 M, pH 8 (400 mL)

Composizione		
$EDTANa_2$ $2H_2O$	74,4	g
Acqua distillata		

Sciogliere l'$EDTANa_2$ in 300 mL di acqua distillata e portare a pH (8±0,2) con HCl o NaOH 0,1 N. Portare a volume finale di 400 mL con acqua distillata.

3.1.3.16. Tampone di caricamento (Orange G)

Composizione		
Orange G	20	mg
Glicerolo	5	mL
Acqua distillata	10	mL

Mescolare i componenti.

3.1.3.17. Pesi molecolari 100-1000 pb

Reperibili in commercio presso ditte specializzate.

3.1.4. Procedura per PCR

3.1.4.1. Estrazione del DNA

Centrifugare il campione (50 µL derivanti dalla reazione di chiarificazione per immunoseparazione) a 13000 rpm per 20 minuti ed eliminare il supernatante. Risospendere il pellet (non sempre visibile) in 94 µL del tampone di lisi (3.1.3.1.). Effettuare 15 cicli di congelamento in azoto liquido della durata di 5 minuti e di scongelamento a (65±1)°C in bagnomaria fino a completo scioglimento del ghiaccio. Aggiungere 6 µL della soluzione di proteinasi K (3.1.3.6.) e incubare tutta la notte a (36±1)°C in bagnomaria, in agitazione. Aggiungere al campione il tampone di preparazione presente nel Kit per estrazione del DNA (3.1.3.7.) e porlo nella colonna di purificazione (3.1.3.7.) precedentemente alloggiata in una provetta da 2 mL. Centrifugare a 10000 × g per 30-60 secondi. Scartare la componente liquida presente nella provetta. Lavare la colonna di purificazione con il tampone di lavaggio fornito nel kit (3.1.3.7.) e centrifugare nuovamente per 30-60 secondi. Scartare la componente liquida e centrifugare nuovamente per 30-60 secondi alla massima velocità. Porre la colonna di purificazione in una nuova provetta da 1,5 mL e aggiungere 50 µL del tampone di eluizione fornito nel kit (3.1.3.7.). Centrifugare la colonna di purificazione per 1 minuto a 10000 × g e conservare la componente acquosa (circa 50 µL).

3.1.4.2. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Il DNA estratto viene utilizzato per una PCR con una coppia di *primer* specifici. Preparare per ogni campione una soluzione (50 µL) 2,5mM di $MgCl_2$ in PCR buffer 1x, 0,5 µM di ogni *primer* (3.1.3.9.), 200 µM di dNTP, contenente 2,5 U\100 µL di Taq Polimerasi e 15 µL del DNA estratto; portare la soluzione a volume finale di 50µL con acqua distillata sterile. Eseguire la PCR per *Cryptosporidium* attivando la polimerasi a (95±1)°C per 10 minuti; proseguire con 40 cicli a 95°C per 20s, a 60°C per 45s e a 72°C per 45 s, con un passaggio di estensione a 72°C per 5 minuti. Eseguire la PCR per *Giardia* attivando la polimerasi a 95°C per 10 minuti; proseguire con 40 cicli a (95±±1)°C per 20s, a (55±1)°C per 45s e a (72±1)°C per 45s, con un passaggio di estensione a (72±1)°C per 5 minuti. Miscelare i prodotti della PCR (16 µL per campione) con 4 µL del tampone di caricamento (3.1.3.16.). Introdurre la miscela nei pozzetti del gel ed effettuare la corsa su gel di agarosio (2%) (3.1.3.12.).

3.1.4.3. Interpretazione dei risultati

Nella corsa elettroforetica, per considerare il risultato positivo è necessario rilevare la presenza di una banda corrispondente a 590 pb per *Cryspospоridium parvum* e a 163 pb per *Giardia* spp. La presenza di un amplificato atteso non fornisce indicazioni sul numero di cisti e oocisti presenti ma permette di rilevare la presenza fino a 60 cisti e 120 oocisti.

3.1.5. Procedura per *nested*-PCR

3.1.5.1. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Il DNA ottenuto nella precedente PCR viene nuovamente amplificato con una coppia di *primer* specifici (3.1.3.10.).

Per ogni campione preparare una soluzione (50 µL) 2,5 mM di $MgCl_2$, in PCR buffer 1×, 0,5 µM di ogni *primer* (3.1.3.10.), 200 µM di dNTP, contenente 2,5 U/100 µL di Polimerasi e 15 µL del prodotto di PCR; portare la soluzione a volume finale di 50 µL con acqua distillata sterile. Eseguire la PCR per *Cryptosporidium* attivando la polimerasi a 95°C per 10 minuti; proseguire con 40 cicli a (95±1)°C per 20 s, a (60±1)°C per 45 s e a (72±1)°C per 45 s, con uno step di estensione a (72±1)°C per 5 minuti. Miscelare i prodotti della PCR (16 µL per campione) con 4 µL del tampone di caricamento (3.1.3.16.). Introdurre la miscela nei pozzetti del gel ed effettuare la corsa su gel di agarosio (2%) (3.1.3.12.).

3.1.5.2. Interpretazione dei risultati

Nella corsa elettroforetica, per considerare positivo il risultato è necessario rilevare la presenza di una banda a 280 pb per *Cryspospоridium parvum.* La presenza di un amplificato atteso non fornisce indicazioni sul numero di oocisti presenti ma permette di rilevare la presenza fino a 12 oocisti.

3.2. Metodo per RT-PCR

3.2.1. Principio del metodo

Metodi molecolari. Viene verificata la capacità delle cisti di *Giardia* spp. e delle oocisti di *Cryptosporidium parvum* di produrre un mRNA specifico, indice della vitalità delle cisti e delle oocisti. Ciò viene effettuato mediante estrazione aspecifica dell'mRNA e successiva RT-PCR con *primer* specifici.

3.2.2. Strumentazione e vetreria (*vedi* 3.1.2.)

3.2.3. Reagenti

3.2.3.1. Kit per estrazione dell' mRNA

Composizione
Sferette paramagnetiche coniugate con oligo($dT)_{25}$;
Tampone di lisi;
Tamponi di lavaggio 1 e 2.

Conservare a (5±3)°C.

3.2.3.2. Soluzione di DEPC -Acqua

Composizione		
DEPC	0,1	g
Acqua distillata	100	mL

Porre il contenitore da utilizzare per preparare la soluzione a (180±1)°C in stufa per almeno 4 ore, con l'ancoretta magnetica e l'apposito tappo.

Mettere l'acqua distillata e il DEPC nel contenitore; mantenere la soluzione in agitazione per tutta la notte mediante agitatore magnetico. Sterilizzare la soluzione in autoclave a (121±3)°C per 20 minuti.

Utilizzare la soluzione a temperatura ambiente.

3.2.3.3. Kit per RT-PCR

Composizione
Soluzione di $MgCl_2$;
Tampone di PCR;
Oligo(dT)16;
Oligonucleotidi (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);
Inibitori delle RNase;
Reverse Transcriptasi;
Polimerasi.

Conservare a-20°C.

3.2.3.4. Matrice Ultrapura

Prima dell'uso porre la matrice su agitatore magnetico a velocità moderata per mantenerla in sospensione.

3.2.4. Procedura

3.2.4.1. Estrazione dell'mRNA

Centrifugare la provetta da 1,5 mL contenente le cisti e le oocisti vitali (50 µL della soluzione derivante dalla reazione di chiarificazione per IMS) a 5000 × g per 5 minuti. Eliminare il supernatante. Aggiungere al pellet ottenuto dalla centrifugazione 200 µL di una matrice ultrapura (3.2.3.4.).

Incubare la provetta a (45±1)°C per non meno di 45 minuti. Nelle fasi successive è necessario lavorare in condizioni refrigerate. Aggiungere successivamente 200 µL del tampone di lisi contenuto nel kit di estrazione dell'mRNA (3.2.3.1.).

Sottoporre la soluzione a 5 cicli di congelamento in azoto liquido e scongelamento in un bagno maria a (37±1)°C.

Dopo aver centrifugato la provetta a 12000 × g per 5 minuti alla temperatura di (4±1)°C, prelevare il supernatante contenente l'mRNA e porlo in una provetta da 1,5 mL.

Agitare manualmente i flaconcini contenenti le sferette paramagnetiche coniugate con Oligo$(dT)_{25}$ (3.2.3.1.). Prelevare 20 µL di sferette per ogni campione e porli in una provetta da 1,5 mL. Alloggiare la provetta nel dispositivo magnetico (2.1.2.) ed eliminare il supernatante; effettuare un lavaggio con il tampone di lisi contenuto nel kit di estrazione dell'mRNA (3.2.3.1.).

Risospendere le sferette in 20 µL di tampone di lisi (3.2.3.1.) e aggiungerle al campione. Agitare manualmente per qualche minuto.

Alloggiare la provetta nel dispositivo magnetico e agitare manualmente per 3-5 minuti compiendo un movimento di circa 90° ogni secondo. Eliminare il supernatante.

Effettuare un lavaggio con 300 µL del tampone di lavaggio 1 e due lavaggi con tampone di lavaggio 2 entrambi contenuti nel kit di estrazione dell'mRNA (3.2.3.1.).

L'mRNA legato alle sferette può essere direttamente aggiunto alla miscela per la reazione di RT-PCR (3.2.4.2.).

3.2.4.2. Reazione di RT-PCR

L'mRNA legato alle sferette viene utilizzato per una reazione di trascrizione inversa in vitro Utilizzando i reattivi contenuti nel kit per RT-PCR (3.2.3.3.) preparare per ogni campione una soluzione (25 µL) 5 mM di $MgCl_2$ in PCR buffer 1x, 1 mM di ogni nucleotide, 1,7 µM di oligo $(dT)_{16,}$ contenente 20U\100 µL di inibitori delle Rnase, 50U\100 µL di Reverse Transcriptasi e 5 µL del mRNA estratto; portare la soluzione a volume finale di 25 µL con DEPC-H_2O (3.2.3.2.).

Scaldare il campione a (42±1)°C per 30 minuti, poi a (95±1)°C per 5 minuti e conservare a (5±3)°C.

Il cDNA ottenuto dalla reazione di RT-PCR viene utilizzato per una PCR con una coppia di *primer* specifici (3.1.3.9.).

Preparare per ogni campione una soluzione (50 µL) 2,5 mM di $MgCl_2$ in PCR buffer 1x, 0,5 µM di ogni *primer* (3.1.3.9.), contenente 1,5 U\100µL di Polimerasi e 10 µL del cDNA; portare al volume finale di 50 µL con acqua distillata sterile.

Eseguire la PCR per *Cryptosporidium* attivando la polimerasi a (95±1)°C per 10 minuti; proseguire con 40 cicli a (95±1)°C per 20 s, a (60±1)°C per 45 s e a (72±1)°C per 45 s, con uno step di estensione a (72±1)°C per 5 minuti.

Eseguire la PCR per *Giardia* attivando la polimerasi a (95±1)°C per 10 minuti; proseguire con 40 cicli a (95±1)°C per 20 s, a (55±1)°C per 45 s e a (72±1)°C per 45 s, con uno step di estensione a (72±1)°C per 5 minuti.

Miscelare i prodotti della PCR (16 µL per campione) con 4 µL del tampone di caricamento (3.1.3.16.). Introdurre la miscela nei pozzetti del gel ed effettuare la corsa su gel di agarosio (2%) (3.1.3.12.).

3.2.4.3. Interpretazione dei risultati

Nella corsa elettroforetica per considerare positivo il risultato è necessario rilevare la presenza di una banda corrispondente a 590 bp per *Crysposporidium parvum* e a 163 bp per *Giardia* spp. La presenza di un amplificato atteso non fornisce indicazioni sul numero di cisti e oocisti presenti, ma permette di rilevare la presenza fino a 10 cisti e 10 oocisti.

Bibliografia di riferimento

EPA/821-R-01-025. Method 1623: *Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/IMS/FA*. Washington, DC: USEPA, Office of Water; 2001.

EPA/821-R-99-001. Method 1622*: Cryptosporidium in Water by Filtration/IMS/FA and viability by DAPI/PI.* Washington, DC: USEPA, Office of Water; 1999.

Hsu BM, Huang C. Performance of the immunomagnetic separation method for *Cryptosporidium* in water under various operation conditions. *Biotechn Prog* 2001;17(6):1114-8.

ISO 15553. Water quality – *Isolation and identification of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts.* Geneva: International Organization for Standardization; 2006.

Sartory DP, Parton A, Parton AC, Roberts J, Bergmann K. Recovery of *Cryptosporidiu*m oocysts from small and large volume water samples using a compressed foam filter system*. Lett Appl Microb* 1998;27:316-22.

DETERMINAZIONE DI ADENOVIRUS E NOROVIRUS

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono ai parametri Adenovirus e Norovirus rilevati con il metodo ISS Pi 009A rev. 00.

I virus enterici sono enteropatogeni trasmessi per via fecale-orale. Appartengono a diverse famiglie tra cui quella dei Picornaviridae (enterovirus, virus dell'epatite A), dei Caliciviridae (norovirus), degli Adenoviridae (adenovirus) e degli Hepeviridae (virus dell'epatite E). Le manifestazioni cliniche più comuni legate ai virus enterici sono le gastroenteriti; tuttavia questi virus sono in grado di causare anche sintomi respiratori, congiuntiviti, epatiti, infezioni del sistema nervoso centrale e malattie croniche.

Negli ultimi anni i virus enterici hanno assunto sempre maggiore importanza come patogeni responsabili di infezioni idrotrasmesse, anche a seguito del miglioramento delle tecniche analitiche che hanno permesso di attribuire a questi virus molti episodi epidemici prima classificati ad eziologia sconosciuta.

Dati di letteratura hanno dimostrato che i virus rappresentano un'importante causa di malattie associate ad acque di tipo ricreativo (piscine, laghi, fiumi, complessi termali, parchi acquatici). I principali gruppi implicati sono i norovirus, seguiti da adenovirus, enterovirus (echovirus e coxsachievirus) e virus dell'epatite A. Nell'ambito delle epidemie idriche associate ad attività ricreative, il 49% è legato all'utilizzo di piscine.

I norovirus (NoV) sono membri della famiglia Caliciviridae responsabili di epidemie e casi sporadici di gastroenterite. Geneticamente sono suddivisi in cinque diversi genogruppi (GI-GV); tre di essi, GI, GII e GIV sono patogeni per l'uomo. La trasmissione avviene principalmente per via fecale-orale attraverso il consumo di acqua o alimenti contaminati. La gastroenterite da NoV è in genere severa ma autolimitante; la malattia può tuttavia provocare gravi conseguenze in soggetti più suscettibili, quali anziani, bambini e immunocompromessi. Recentemente è emerso che i norovirus possono indurre manifestazioni cliniche diverse dalla gastroenterite, come encefalopatia, enterocolite necrotizzante nei neonati, coagulazione disseminata intravascolare, sindrome del colon irritabile post-infettiva e convulsioni infantili benigne.

A seguito del clonaggio del virus nel 1990, è stato possibile chiarire il ruolo primario dei NoV nella maggior parte degli episodi di gastroenterite precedentemente considerati ad eziologia sconosciuta. Da allora, sono state descritte oltre 25 epidemie associate ad attività ricreative, di cui 8 da acque di piscina.

Gli adenovirus appartengono al genere Mastadenovirus, di cui si riconoscono attualmente 7 specie (A-G) e oltre 50 sierotipi. Sono responsabili di numerose malattie che colpiscono vari organi e apparati, in modo particolare gli occhi, la faringe, l'apparato respiratorio e quello gastrointestinale. Di conseguenza provocano molteplici manifestazioni cliniche, le più comuni legate ad infezioni del primo tratto respiratorio; talvolta si possono osservare patologie a carico del tratto respiratorio inferiore, come bronchioliti e polmoniti. La febbre acuta faringocongiuntivale è una malattia acuta febbrile caratteristica dei bambini che si presenta per lo più in forma di epidemie, caratterizzata da una congiuntivite bilaterale, febbre, rinite, faringodinia e linfoadenopatia laterocervicale. Gli adenovirus sono associati anche a gastroenteriti e cistiti emorragica. In letteratura sono documentate 14 epidemie da adenovirus associate ad attività ricreative, di cui 12 da acque di piscina.

Gli enterovirus sono un genere della famiglia Picornaviridae. Sebbene la maggioranza delle infezioni sia asintomatica, questi virus possono causare un'ampia gamma di sindromi cliniche:

da patologie delle prime vie respiratorie a rash febbrile, meningite asettica, pleurodinia, encefalite, paralisi flaccida acuta. Possono anche essere implicati nella patogenesi di malattie croniche, tra cui diabete mellito di tipo 1. Sono state documentate 13 epidemie di origine idrica associate ad attività ricreative (10 da echovirus, 3 da coxsackievirus), di cui 8 in acque di piscina. Due di queste, entrambe da echovirus 30, si sono verificate in Italia.

Le epidemie virali trasmesse in acque di piscine sono sottostimate, a causa della difficoltà di associazione tra sintomatologia e frequentazione di una piscina e soprattutto per le difficoltà legate alla identificazione dei virus nella matrice idrica.

I virus sono presenti nelle acque a basse concentrazioni; pertanto per la loro identificazione è necessario analizzare volumi elevati, nettamente superiori a quelli utilizzati per le analisi batteriologiche. Ciò comporta la necessità, in molti casi, di eseguire una prima fase di concentrazione (concentrazione primaria) del campione sul campo per poi procedere con una concentrazione secondaria in laboratorio, per ottenere volumi adatti per l'identificazione virale utilizzando metodiche cellulari o molecolari. Le metodiche più utilizzate per la concentrazione (primaria) dei virus enterici in campioni di acque sono l'ultrafiltrazione e l'adsorbimento-eluizione su membrane elettropositive o elettronegative. Per una rassegna esaustiva sui metodi per la ricerca dei virus in matrici idriche si suggerisce di consultare la letteratura specifica.

Sebbene non venga richiesto dalla normativa, in questa sezione verrà illustrato un metodo per la determinazione di adenovirus e norovirus in acque di piscina. I due gruppi sono stati scelti, tra la varietà di virus enterici in esse potenzialmente presenti, sia perché rappresentano patogeni virali emergenti per le acque, sia per la provata associazione con malattie trasmesse da acque di piscina. Sono inoltre inclusi nella *Contaminant Candidate List* (CCL) 3 dell'Agenzia regolatoria statunitense per la protezione ambientale (EPA, *Environmental Protection Agency*) tra i patogeni prioritari per l'acqua, insieme ad enterovirus e virus dell'epatite A. Gli enterovirus, sebbene ben conosciuti come patogeni idrotrasmessi, presentano un ruolo minore rispetto ad adenovirus e norovirus per le acque di piscina, sulla base dei dati disponibili in letteratura; pertanto non verranno trattati in questa sezione. Tuttavia, qualora si ritenesse utile la ricerca di enterovirus in acque di piscina, è possibile utilizzare il sistema di concentrazione delle acque descritto di seguito e successivamente, per l'identificazione virale, le metodiche di colture cellulari descritte in *Rapporti ISTISAN* 07/5 o nei metodi descritti dall'EPA.

Si sottolinea, comunque, che per la determinazione dei virus in matrici idriche, allo stato attuale delle conoscenze, risulta impossibile elaborare protocolli standard che descrivano virus da ricercare, metodi di campionamento dettagliati, e tecniche analitiche da utilizzare. Di seguito, quindi, verranno presentate le procedure analitiche più comunemente utilizzate per la concentrazione e l'identificazione di virus nelle acque, facendo riferimento a metodi descritti dall'EPA e dall'OMS, messi a punto per diverse tipologie di acque e sulla base delle esperienze maturate.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica ISS Pi 009A rev. 00 viene utilizzata per la determinazione di adenovirus e norovirus nelle acque di piscina e di ambienti simili.

La disciplina sulle piscine non prevede la determinazione dei virus enterici tra i parametri microbiologici in questa tipologia di acque. Tuttavia, la loro ricerca può essere utile nel caso in cui indagini epidemiologiche su episodi di malattie virali indichino una possibilità di trasmissione idrica associata a piscine.

2. Metodo ISS Pi 09A rev. 00

2.1. Principio del metodo

Metodo di concentrazione su membrana o cartuccia. Il metodo prevede una fase iniziale di concentrazione dei virus mediante un protocollo consigliato dall'EPA per l'identificazione di enterovirus e norovirus nelle acque (Metodo 1615), basato sull'assorbimento-eluizione utilizzando membrane o cartucce elettropositive. Sugli eluati recuperati dalle membrane o dai filtri si procede all'identificazione di adenovirus e norovirus utilizzando i metodi molecolari (*nested*-PCR) descritti di seguito.

2.2. Strumentazione e materiali

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A), è necessario avere a disposizione:
- apparato per filtrazione su membrana o cartuccia (*vedi* Figura 1 a pag. 149);
- pompa peristaltica;
- centrifuga refrigerata per velocità fino a 10.000 g;
- termociclatore per PCR;
- apparato per corsa elettroforetica orizzontale corredato di supporti per gel e pettini;
- alimentatore per elettroforesi;
- transilluminatore per rendere visibile il DNA in presenza di bromuo di etidio o altro colorante per acidi nucleici.

2.3. Volume da analizzare

Sulla base dei dati presenti in letteratura, per l'analisi virologica delle acque di piscina si consiglia l'analisi di almeno 10 litri di acqua.

2.4. Reagenti

2.4.1. Soluzione di acido cloridrico (HCl) 1N

Composizione		
Acido cloridrico al 37% (12N HCl)	8,2	mL
Acqua distillata		

Portare a volume di 100 mL. Le soluzioni di HCl possono essere conservate per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.4.2. Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 1N

Composizione	
Idrossido di sodio	4 g
Acqua distillata	

Portare a volume di 100 mL. Le soluzioni di NaOH possono essere conservate per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.4.3. Estratto di carne (BE) all'1,5%, pH 9.0-9.5 (eluente), con glicina 0,05%

Composizione		
Beef Extract	30	g
Glicina	7,5	g
Acqua distillata		

Portare a volume di 2 L. 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 (2.4.2.) e portare a volume. Sterilizzare in autoclave per 15 minuti a (121±1)°C e usare a temperatura ambiente. Le soluzioni di estratto di carne possono essere conservate per una settimana a (5±3)°C, o per periodi più lunghi a (-20±3)°C.

2.4.4. Soluzione di fosfato di sodio 0,15 M, pH 9,0

Composizione		
Fosfato di sodio eptaidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)	40,2	g
Acqua distillata		

Portare a volume di 1 L. Sciogliere la soluzione utilizzando una barretta magnetica; portare il pH a 9,0 con HCl (2.4.1.) se necessario e sterilizzare in autoclave a (121±1)°C per 15 minuti. La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per 12 mesi a temperatura ambiente.

2.4.5. Soluzione di fosfato di sodio 0,15 M, pH 7-7,5

Composizione		
Fosfato di sodio eptaidrato ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)	40,2	g
Acqua distillata		

Portare a volume di 1 L. Sciogliere la soluzione utilizzando una barretta magnetica; portare il pH a 7-7,5 con HCl (2.4.1.) se necessario e sterilizzare in autoclave a (121±1)°C per 15 minuti. La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per 12 mesi a temperatura ambiente.

2.4.6. Soluzione di polietilenglicol (PEG) 6000 al 29%

Composizione		
PEG 6000	363	g
Acqua distillata	888	mL

Sciogliere il PEG 6000 in acqua con l'aiuto di un agitatore magnetico. Si conserva per 2 settimane a (5±3)°C.

2.4.7. Destrano al 22%

Composizione		
Destrano T40	40	g
Acqua distillata	142	mL

Sciogliere il destrano T40 in acqua distillata con l'aiuto di un agitatore magnetico. Si conserva 2 settimane a (5±3)°C.

2.4.8. Cloruro di sodio (NaCl) 5N

Composizione		
Cloruro di sodio	146,1	g
Acqua distillata		

Portare a volume di 500 mL. Sciogliere il cloruro di sodio in acqua distillata con l'aiuto di un agitatore magnetico. Conservare a temperatura ambiente.

2.4.9. Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) 0,5 M, pH 8

Composizione		
EDTA• $2H_2O$	186,1	g
Acqua distillata		

Portare a volume di 1 L. Sciogliere l'EDTA in circa 400 mL di acqua distillata, portare a pH 8.0 con NaOH (2.4.2.). Il sale non passa in soluzione finché non raggiunge pH 8. Sterilizzare in autoclave a (121±1)°C per 15 minuti.

2.4.10. Tris Borato EDTA (TBE), 10X

Composizione		
Tris base (tris(idrossimetil)amminometano)	107,81	g
Acido borico	55,04	g
EDTA 0.5M pH 8 (2.4.9.)	40	mL
Acqua distillata		

Portare a volume di 1 L. Sciogliere il tris e l'acido borico in circa 500 mL di acqua distillata con l'aiuto di un agitatore magnetico, controllare il pH (generalmente pH 8,3), portare a volume e sterilizzare in autoclave a (121±1)°C per 15 minuti.

2.4.11. Tris Borato EDTA (TBE), 1X

Composizione		
TBE 10X (2.4.10.)	200	mL
Acqua distillata		

Portare a volume di 2 L.

2.4.12. Sodio ipoclorito (NaClO), 0,525%

Composizione		
Sodio ipoclorito	100	mL
Acqua distillata		

Portare a volume di 1 L. La soluzione si conserva per una settimana a temperatura ambiente.

2.4.13. Tiosolfato di Sodio pentaidrato ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$), 1M

Composizione		
Tiosolfato di sodio	248,2	g
Acqua distillata		

La soluzione si conserva per 6 mesi a temperatura ambiente.

2.4.14. Gel di agarosio 2%

Composizione		
Agarosio	2	g
TBE 1X (2.4.11.)	100	mL

Sciogliere l'agarosio in tampone TBE 1X portandolo ad ebollizione; prima che il gel raffreddi, a circa 50°C, aggiungere il colorante Bromuro di Etidio (EtBr) (concentrazione finale di 0,5 g/mL) e colare su un supporto di plastica nel quale è stato inserito un pettine per la formazione dei pozzetti all'interno del gel.

Il bromuro di etidio è mutageno e può provocare alterazioni genetiche ereditarie. È irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. Nocivo per ingestione. Altamente tossico per inalazione. Usare sotto cappa e con DPI. Il prodotto non deve essere smaltito in fogna. In sostituzione sono disponibili in commercio intercalanti del DNA di tipo diverso con minori indicazioni di rischio per la salute (es. gel-red) (per transilluminatori UV) o Gel Green (per trans illuminatori a luce visibile).

A temperatura ambiente il gel polimerizza in 10-15 minuti; quando si solidifica il gel diventa opaco. Il supporto deve essere poi assemblato su apposito apparecchio per elettroforesi.

2.5. Procedura

Questa sezione descrive tutte le fasi (concentrazione dell'acqua, estrazione degli acidi nucleici, PCR/RT-PCR, elettroforesi della PCR) di un metodo per la determinazione qualitativa del DNA di adenovirus e dell'RNA di norovirus genogruppo I (GI) e II (GII) in campioni di acque di piscina. Le fasi della concentrazione, eluizione ed estrazione del DNA /RNA sono in comune per i due patogeni. Seguono poi PCR specifiche.

2.5.1. Controllo di Processo (CP)

Durante il trattamento del campione, dalla concentrazione all'estrazione degli acidi nucleici, si possono verificare perdite dei virus target. Per controllare i recuperi dei virus nel campione incognito, è opportuno addizionare, prima della fase di concentrazione, una quantità definita di un virus di controllo (controllo di processo, CP).

Un virus di controllo selezionato come CP deve avere una persistenza ambientale simile a quella del virus target e non deve essere naturalmente presente nei campioni da analizzare. Esempi di virus utilizzabili come CP sono il calicivirus felino e il norovirus murino. Per protocolli dettagliati sull'utilizzo del calicivirus felino come CP, si consiglia di consultare la letteratura specifica.

2.5.2. Concentrazione primaria: metodo della filtrazione su membrana (MF)

2.5.2.1. Filtrazione

La concentrazione dei virus si effettua su membrane cariche positivamente, utilizzando il metodo "Viradel". I filtri più comunemente utilizzati sono i filtri del tipo Zeta Plus e Virosorb 1MDS. È comunque possibile reperire in commercio altri tipi di filtri a carica superficiale modificata. Recentemente sono state utilizzate con successo le cartucce filtranti pieghettate Nanoceram, prodotto della nanotecnologia, con portata molto superiore alle membrane filtranti. Tali cartucce possono essere utilizzate per filtrare elevati volumi d'acqua (fino a 1000 litri e oltre) sul campo. La cartuccia è composta di una miscela di microfibre di vetro e di cellulosa infuse e unite termicamente con fibre di nano-alluminia. Deve essere montata in appositi porta filtro che sono composti da un elemento superiore, in polipropilene, dove collegare i tubi, e da un "bicchiere" trasparente dove viene sistemata la cartuccia (Figura 1 in alto). I due elementi vengono fissati tramite una apposita ghiera. Le membrane, invece, si sistemano in un apposito apparato di filtrazione collegato a una pompa peristaltica (Figura 1 in basso). Prima di filtrare il campione, collegare i supporti alla pompa, e lasciare scorrere circa 10 litri d'acqua distillata; procedere con la filtrazione del campione attraverso le membrane o le cartucce, regolando il flusso in modo tale da mantenere una velocità non superiore a 1 L/minuto. Lo schema dei due sistemi è mostrato in Figura 1 (in alto, filtrazione con cartuccia; in basso, filtrazione con membrana).

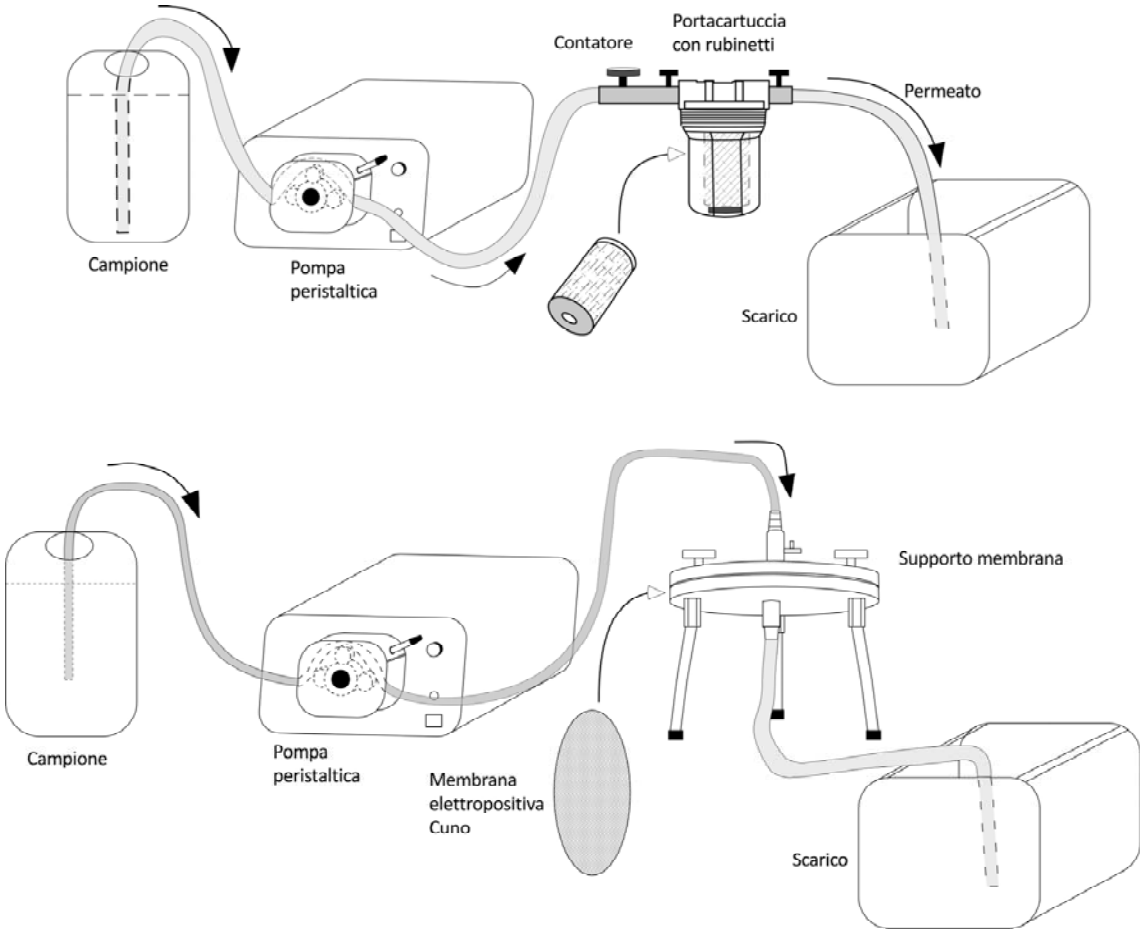


Figura 1. Apparato per la filtrazione con cartucce (in alto) e con membrane (in basso)

Al termine della filtrazione, sterilizzare l'apparato prima di procedere con il campione successivo, lavando accuratamente tutti i componenti (tubi e supporti) con sodio ipoclorito 0,525% (2.4.12.), poi con acqua distillata e infine con tiosolfato di sodio (2.4.13.). Per ultimo, sciacquare tutti i componenti con acqua distillata. In alternativa è possibile far passare nell'apparato 5-10 litri di acqua calda (a temperatura oltre gli 80°C).

2.5.2.2. Eluizione

A filtrazione avvenuta eluire le particelle virali adsorbite ai filtri usando 500 mL di soluzione all'1,5% di BE (2.4.3.) a pH 9 preriscaldato a temperatura ambiente, facendo ricircolare la soluzione di eluizione per 20 minuti. In alternativa è possibile trasferire il filtro in un contenitore, ricoprirlo con 500 mL di BE pH 9 e lasciarlo in agitazione per 20 minuti. Neutralizzare l'eluato a pH 7-7,5 e sottoporlo a concentrazione secondaria mediante flocculazione organica o precipitazione PEG. Nel caso in cui il campione sia concentrato sul campo, trasportare dopo la filtrazione, la membrana o la cartuccia a freddo (evitando il congelamento) ed eluirle in laboratorio entro le 24-48 ore dalla filtrazione.

2.5.3. Concentrazione secondaria

2.5.3.1. Flocculazione organica

Esistono in commercio estratti di carne preparati e consigliati per la flocculazione organica. Particolare cura deve essere posta nella scelta dell'estratto di carne come flocculante in quanto sono state notate differenze significative tra le diverse case produttrici, così come tra i diversi lotti di una stessa casa.

Trasferire 500 mL di BE proveniente dalla fase di eluizione in un becker sopra un agitatore magnetico e mantenere in agitazione. Portare la soluzione proteica a pH 3,5±0,2 lentamente aggiungendo HCl (2.3.1.) goccia a goccia, dopo aver calibrato il pH-metro a pH 4 e 7. Mantenere la soluzione in agitazione lenta per 30 minuti continuando a monitorare il pH, mantenendolo nell'intervallo previsto. Se il pH scende sotto 3,4 aggiungere NaOH per riportarlo a pH 3,5±0,2 per evitare l'inattivazione dei virus. Si formerà un flocculo più o meno evidente.

Centrifugare il campione a 2.500 g per 15 minuti a circa 4°C in più provette da centrifuga. Rimuovere il supernatante facendo attenzione a non toccare il pellet contenente i virus; risospendere il pellet con 15 mL totali di una soluzione sterile di 0,15 M Na_2HPO_4 pH 9,0 (2.3.4.). Poiché notevoli perdite di virus possono verificarsi se il pellet non si scioglie completamente, lasciare il tampone fosfato ad agitare su agitatore magnetico per almeno 10 minuti. Dopo solubilizzazione del pellet riportare il pH a 7-7,5 e centrifugare la soluzione a 10.000 g per 10 minuti a circa 4°C. Raccogliere il surnatante e scartare il pellet. Procedere all'estrazione degli acidi nucleici.

2.5.3.2. Precipitazione con polietilenglicole 6000

In alternativa alla flocculazione acida, si può procedere con la precipitazione con polietilenglicole (PEG), secondo la metodica di separazione bifasica suggerita dall'OMS che prevede, per la concentrazione del campione, l'utilizzo di destrano al 22% (2.3.7.), PEG 6000 al 29% (2.3.6.), NaCl 5N (2.3.8.). Aggiungere ai 500 mL ottenuti nella fase di eluizione (2.4.3.2.), 287 mL di PEG 6000 al 29% e 35 mL di NaCl 5N e mantenere in agitazione costante per 1 ora a circa 4°C su agitatore magnetico. Trasferire la miscela in un imbuto separatore posizionato su un apposito sostegno e lasciare tutta la notte a circa 4°C. Il giorno seguente, le due fasi PEG/destrano saranno ben separate e visibili; aprire il rubinetto di chiusura e, lentamente, goccia a goccia, raccogliere lo strato inferiore e l'interfaccia contenente i virus.

In alternativa, si può utilizzare un protocollo PEG senza destrano, utilizzando una centrifuga refrigerata per la raccolta dei virus. In tal caso si prepara una miscela contenente PEG e NaCl, si

mantiene in agitazione costante per 1 ora a circa 4°C su agitatore magnetico e si lascia tutta la notte a circa 4°C. Il giorno successivo centrifugare a 10.000 g per 30 minuti a circa 4°C e risospendere il pellet in 15 mL di PBS sterile pH 7,2±0,2. Procedere all'estrazione degli acidi nucleici.

2.5.4. Estrazione degli acidi nucleici

L'estrazione degli acidi deve fornire preparazioni di DNA/RNA pulite per ridurre l'effetto degli inibitori della PCR. Per l'estrazione degli acidi nucleici possono essere utilizzati diversi kit commerciali che consentono di ottenere estratti di acidi nucleici ad elevato grado di purezza, alcuni in grado di estrarre grandi volumi di partenza (es. NucliSens miniMAG). Uno dei metodi più utilizzati utilizza l'agente caotropico guanidina isotiocianato per rompere il capside virale; l'RNA o il DNA è poi assorbito su silice, purificato mediante diversi lavaggi ed eluito dalla silice con un opportuno tampone di eluizione. Per i volumi da estrarre seguire le istruzioni allegate ai kit di estrazione.

2.5.5. Test molecolari

I protocolli di PCR descritti sono stati utilizzati con successo per l'identificazione di adenovirus e norovirus in diversi tipi di acque ad uso ricreativo. Entrambi utilizzano *nested*-PCR in cui il prodotto di una prima reazione di PCR è usato da stampo per una seconda reazione, in cui si usano *primer* che si appaiano più internamente rispetto alla coppia di *primer* iniziale. Tale metodo consente di aumentare la sensibilità e la specificità della reazione.

I protocolli per adenovirus e per norovirus utilizzano sequenze di primer descritti nella letteratura specifica. Le sequenze dei rispettivi *primer* sono descritte in Tabella 1. Possono essere utilizzate altre coppie di *primer* per i due gruppi di virus, purché pubblicati in riviste indicizzate e verificate per l'abilità di identificare un vasto spettro di genotipi/sierotipi dei virus target.

Tabella 1. *Primer* per PCR

Primer	Sequenza (5'-3')	Prodotto amplificato (bp)	Ciclo PCR	Virus	Note
Hex1deg	GCCSCARTGGKCWTACATGCACATC	301 bp	I	Adenovirus	a
Hex2deg	CAGCACSCCICGRATGTCAAA				
nehex3deg	GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC	171 bp	II		
nehex4deg	CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA				
JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	327 bp	I	Norovirus GI e GII	b
JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG				
JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	237 bp	II	Norovirus GII	b, c, d
Ni-R	AGCCAGTGGGCGATGGAATTC				
G1-V	TCNGAAATGGATGTTGG	188 bp	II	Norovirus GI	
JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG				

a. Sinclair *et al*., 2009.
b. Vennema *et al*., 2002
c. WHO, 2003.
d. Wyn-Jones *et al*., 2011.

2.5.5.1. Precauzioni per evitare contaminazioni

A causa della sua elevata sensibilità, la PCR può dare falsi positivi, per amplificazione di piccole quantità di DNA contaminante presente nelle provette, nei puntali, nei tamponi e negli enzimi usati nel corso della reazione. Per minimizzare il problema dei falsi positivi dovuti a contaminazione esterna è necessario osservare alcune precauzioni di carattere generale:

- preparare la reazione usando puntali protetti da filtri e lavorare in cappe a flusso laminare; un set di pipette dovrebbe essere dedicato esclusivamente alla preparazione della master mix, che dovrebbe aver luogo in una area di lavoro per PCR separata dal resto del laboratorio e sterilizzabile con UV;
- conservare i campioni biologici da testare, gli acidi nucleici estratti, i controlli positivi e tutti i prodotti amplificati in luogo separato dai reagenti di retrotrascrizione e amplificazione;
- organizzare una suddivisione degli ambienti pre- e post-amplificazione; non far circolare attrezzature e consumabili (pipette, provette, puntali, ecc.) da un ambiente all'altro;
- cambiarsi regolarmente i guanti; pulire le superfici di lavoro con ipoclorito di sodio al 5%;
- utilizzare sistemi per ridurre i falsi positivi dovuti a contaminazioni di DNA già amplificato. Un sistema largamente utilizzato prevede l'utilizzo dell'uridina trifosfato (UTP) al posto della desossitimidina trifosfato (dTTP) e l'aggiunta dell'enzima uracil N-glicosilasi (UNG) nella miscela di reazione. Durante l'allestimento della reazione di PCR, la presenza dell'enzima UNG nella miscela di reazione, distruggerà qualunque residuo di precedenti amplificazioni eventualmente presenti nella reazione senza disturbare il DNA stampo. All'inizio della reazione di PCR, l'elevata temperatura del primo step di amplificazione provvederà a distruggere l'UNG prima della sintesi delle nuove molecole bersaglio;
- includere sempre negli esperimenti un controllo negativo (miscela di reazione contenente acqua sterile al posto del DNA/RNA del campione) per escludere le contaminazioni.

2.5.5.2. PCR per adenovirus

Per l'identificazione di adenovirus umani si utilizza la *nested*-PCR descritta da Allard e coll., mediante i *primer* Hex1deg e Hex2deg per il primo ciclo di amplificazione e *primer* nehex3deg and nehex4deg per il secondo ciclo. Le reazioni amplificano frammenti di 301 bp e 171 bp, rispettivamente. Un controllo di amplificazione interno (IAC, Internal Amplification Control) può essere incorporato nel test; è possibile utilizzare l'enzima UNG per prevenire la contaminazione da *carryover*. Per le reazioni PCR possono essere utilizzati diversi kit commerciali seguendo le istruzioni allegate ai prodotti. Di seguito la preparazione della miscela di amplificazione utilizzando il kit Platinum® Taq DNA polymerase, Life Technologies Inc.

2.5.5.2.1. Allestimento del mix di reazione

Una volta scongelati, miscelare i reagenti invertendo più volte le provette, quindi sottoporli a breve centrifugazione. Allestire velocemente la reazione a temperatura ambiente oppure lavorare in ghiaccio o su blocco di raffreddamento. Preparare un mix sufficiente per il numero di campioni che si intende analizzare, conteggiando anche il caricamento di un controllo positivo (DNA/RNA estratto da uno standard di adenovirus/norovirus) e di un controllo negativo. Per ciascun campione preparare un mix in 50 µL finali, contenente: 10 µL di DNA del campione da testare, 1 X Platinum® Taq buffer, 1,5 mM Mg++, 250 µM dNTPs, 0,5 µM *primer* Hex1deg, 0,5 µM *primer* Hex2deg, 1 U Platinum® Taq, 1 U dell'enzima HK-UNG (Epicentre, Madison, Wisconsin). Incubare la miscela a 50°C per attivare UNG e poi a 95°C per inattivare l'UNG e attivare la Taq polimerasi. Seguono 45 cicli di amplificazione, ciascuno comprendente 94°C per 30 secondi, 55°C per 30 secondi e 72°C per 1 minuto, seguiti da una estensione finale

a 72°C per 5 minuti. Nel secondo ciclo di PCR utilizzare come stampo 2 µL del prodotto di amplificazione della prima reazione in una miscela di 50 µL contenente: 1 X Platinum® Taq buffer, 1,5 mM Mg++, 100 µM dNTPs, 0,5 µM *primer* nehex3deg, 0,5 µM *primer* nehex4deg, e 1 U Platinum® Taq. Incubare la miscela alle seguenti condizioni: 94°C per 3 minuti, poi 45 cicli di 94°C per 30 secondi, 55°C per 30 secondi e 72°C per 1 minuto, seguiti da una estensione finale a 72°C per 5 minuti.

2.5.5.3. PCR per norovirus

Per l'identificazione dei norovirus si utilizza la RT-*nested*-PCR descritta da Vennema e coll., che utilizza nel primo ciclo una coppia di *primer* in grado di amplificare contemporaneamente i genogruppi GI e GII (prodotto di PCR di 327 bp) e nel secondo ciclo (*nested*), reazioni separate per GI (prodotto di PCR 188 bp) e GII (prodotto di PCR 237 bp). Di seguito si descrive la preparazione della miscela di reazione utilizzando il kit QIAGEN OneStep RT-PCR per il primo ciclo di RT-PCR e il kit Platinum® Taq DNA polymerase, Life Technologies Inc., per il secondo ciclo; possono essere utilizzati kit diversi seguendo le istruzioni allegate al prodotto.

2.5.5.3.1. Allestimento del mix di reazione

Preparare i reagenti come descritto in 5.6.2.1 Per ciascun campione preparare un mix in 50 µL finali, contenente: 10 µL di RNA del campione da testare, 1 X OneStep buffer (Qiagen, UK), 400 µM di ciascun dNTP, 1 X OneStep enzyme mix (Qiagen, UK), 0,5 µM *primer* JV12Y, 0,5 µM *primer* JV13i, 50 U RNasin (RNasin®Plus, Promega, UK), 1 U Platinum® Taq (Life Technologies Inc.). Incubare la miscela a 50°C per 30 minuti, 95°C per 15 minuti, poi 40 cicli di 94°C per 1 minuto, 37°C per 1 minuto e 72°C per 1 minuti, seguiti da una estensione finale a 72°C per 10 minuti. I *primer* utilizzati sono in grado di amplificare contemporaneamente i genogruppi I (GI) e II (GII) di norovirus. Per il secondo ciclo di PCR preparare due diverse reazioni per GI e GII, utilizzando come stampo 1 µL del prodotto di amplificazione della prima reazione. Preparare le reazioni in miscele di 50 µL contenenti: 1 X Platinum® Taq buffer, 2,0 mM Mg++, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 400 µM dUTP, 0,4 µM dei *primer* forward e reverse (*primer* JV12Y e Ni-R per norovirus GII; *primer* G1-V e JV13i per norovirus GI, *vedi* Tabella 1), 1 U HK-UNG e 1 U Platinum® Taq. Incubare la miscela a 50°C per 10 minuti, 95°C for 10 minuti, 96°C per 3 minuti; seguono 40 cicli di 95°C per 1 minuto, 40°C per 1 minuto e 72°C per 1 minuto e un ciclo di estensione finale a 72°C per 10 minuti.

2.5.5.4. Analisi su gel di agarosio di prodotti di *nested*-PCR

Il prodotto di PCR può essere visualizzato facilmente mediante elettroforesi su gel di agarosio in cui un marcatore di pesi molecolari (DNA ladder), costituito da frammenti di DNA aventi dimensioni note, viene fatto migrare insieme ai campioni di DNA come riferimento dimensionale. Il marcatore servirà per il calcolo della lunghezza in basi delle bande incognite. Sottoporre ciascun campione amplificato ad analisi elettroforetica utilizzando un gel d'agarosio al 2% (4.14.). In ciascun pozzetto del gel seminare 10 µL di ogni campione miscelati con 2 µL di Gel loading solution concentrato 6x. Come riferimento utilizzare un DNA ladder 100bp diluito secondo le istruzioni della ditta. Eseguire la corsa ad un voltaggio costante (80-100 volt) per circa un'ora. Dopo la corsa elettroforetica porre e fotografare il gel su un transilluminatore a luce UV, per verificare la presenza dei frammenti di PCR attesi (171 bp per adenovirus, 188 bp per norovirus GI e 237 bp per norovirus GII).

2.6. Interpretazione dei risultati

I campioni sono considerati positivi se è presente una banda della grandezza attesa (2.5.5.4.). Se i risultati osservati per i controlli differiscono da quelli attesi, il test dovrebbe essere ripetuto. In particolare, se sono presenti bande nei controlli negativi, ogni campione che presenta risultati positivi deve essere ritestato. Analogamente, devono essere ripetuti campioni con risultati negativi in assenza di segnale nel controllo positivo.

2.7. Espressione dei risultati

La metodica descritta consente di ottenere risultati qualitativi di "presenza/assenza di genoma virale nel volume di acqua analizzato".

2.8. Metodi alternativi

È possibile ottenere risultati quantitativi espressi come "numero di copie genomiche nel volume di acqua analizzato" mediante una PCR quantitativa (Real-Time PCR). Protocolli dettagliati per la determinazione quantitativa di adenovirus e norovirus nelle acque sono descritti nella letteratura specifica e nel Metodo 1615 dell'EPA. Nel manuale dell'EPA sono inoltre descritti metodi per la ricerca degli enterovirus nelle acque mediante *Real-Time* PCR e colture cellulari. Nel caso di utilizzo di colture cellulari per l'identificazione dei virus, i contenitori utilizzati per i campionamenti devono contenere sodio tiosolfato in concentrazione idonea ad inibire l'azione del disinfettante.

Bibliografia di riferimento

Allard A, Albinsson B, Wadell G. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol* 2001;39:498-505.

Artieda J, Pineiro L, Gonzalez M, Munoz M, Basterrechea M, Iturzaeta A, Cilla G. A swimming pool-related outbreak of pharyngoconjunctival fever in children due to adenovirus type 4, Gipuzkoa, Spain, 2008. *Euro Surveill* 2009;14:19125.

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

Boxman IL, Tilburg JJ, Te Loeke NA, Vennema H, Jonker K, de Boer E, Koopmans MP. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol* 2006;108:391-396.

Di Pasquale S, Paniconi M, De MD, Suffredini E, Croci L. Duplex Real Time PCR for the detection of hepatitis A virus in shellfish using Feline Calicivirus as a process control. *J Virol Methods* 2010;163:96-100.

Faustini A, Fano V, Muscillo M, Zaniratti S, La Rosa G, Tribuzi L, Perucci CA. An outbreak of aseptic meningitis due to Echovirus 30 associated with attending school and swimming in pools . *Int J Infect Dis* 2006;10:291-297.

Fout GS, Brinkman NE, Cashdollar JL, Griffin SM, McMinn BR, Rhoads RE, Varughese E.A., Karim MR, Grimm AC, Spencer SK (2012) Method 1615: measurement of enterovirus and norovirus occurrence in water by culture and RT-qPCR, publication no EPA/600/R-10/181. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Green J, Henshilwood K, Gallimore CI, Brown DW, Lees DN. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:858-863.

Hata A, Katayama H, Kitajima M, Visvanathan C, Nol C, Furumai H. Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in water samples. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:4336-4343.

Ikner LA, Gerba CP, Bright KR. Concentration and recovery of viruses from water: a comprehensive review. *Food Environ Virol* 2012;4:41-67.

La Rosa G, Muscillo M. Molecular detection of viruses in water and sewage. In: Nigel Cook (Ed.). *Viruses in food and water: risks, surveillance and control*. Fera, UK: Woodhead Publishing; 2013. (Food Science, Technology and Nutrition No. 249).

La Rosa G, Fratini M, Della Libera S, Iaconelli M, Muscillo M. Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Ann Ist Super Sanita* 2012;48:397-406.

Manzara S, Muscillo M, La Rosa G, Marianelli C, Cattani P, Fadda G. Molecular identification and typing of enteroviruses isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:4554-60.

Mattison K, Brassard J, Gagne MJ, Ward P, Houde A, Lessard L, Simard C, Shukla A, Pagotto F, Jones TH, Trottier YL. The feline calicivirus as a sample process control for the detection of food and waterborne RNA viruses. *Int J Food Microbiol* 2009;132:73-7.

Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2006;44:2698-704.

Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol* 2009;107:1769-80.

Vennema H, de Bruin E, Koopmans MP. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol* 2002;25:233-5.

World Health Organization *Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation.* Geneva: WHO; 2003.

Wyn-Jones AP, Carducci A, Cook N, D'Agostino M, Divizia M, Fleischer J, Gantzer C, Gawler A, Girones R, Holler C, de Roda Husman AM, Kay D, Kozyra I, Lopez-Pila J, Muscillo M, Nascimento MS, Papageorgiou G, Rutjes S, Sellwood J, Szewzyk R, Wyer M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res* 2011;45:1025-38.

DETERMINAZIONE DI BATTERI, FUNGHI E DERMATOFITI SULLE SUPERFICI

0. Generalità

I metodi di seguito descritti si riferiscono alla determinazione di batteri, funghi e dermatofiti rilevati con i metodi ISS Pi 010A rev. 00; ISS Pi 010B rev. 00.

Le piscine, quali ambienti circoscritti, possono favorire l'instaurarsi di condizioni di rischio per la salute dei bagnanti e di chi vi opera.

La condizione di rischio maggiore e più frequente è rappresentata dalla presenza di microrganismi che possono essere veicolati attraverso l'acqua, superfici infette o per contatto diretto con soggetti infetti.

Nonostante un'antica conoscenza del fenomeno, si registra un modesto impegno generale nello studio sistematico delle condizioni morbose contraibili in piscina.

Inoltre, a fronte di una maggiore attenzione nei confronti delle patologie acquisibili attraverso l'acqua, si registrano pochi controlli verso le infezioni trasmissibili per contatto diretto o attraverso le superfici.

Da questo punto di vista, in un impianto natatorio i possibili punti critici sono rappresentati da tutte le superfici degli spazi perimetrali intorno alle vasche, degli spogliatoi, dei servizi e dei percorsi a piedi nudi, luoghi dove condizioni di umidità relativa, temperature idonee e scarse condizioni di igiene e pulizia possono favorire la diffusione di microrganismi.

Oltre ai batteri, anche i funghi del gruppo dei dermatofiti possono essere responsabili di infezioni associate all'uso delle piscine. Il loro habitat è solitamente il suolo; tuttavia alcuni, grazie al loro ricco corredo enzimatico (cheratinasi, proteasi) sono in grado di moltiplicarsi anche nell'uomo e negli animali. Le infezioni da funghi dermatofiti possono attuarsi con due modalità: per contagio diretto o indiretto e per autocontagio. La trasmissione tramite biancheria, teli, indumenti intimi, pavimenti degli spogliatoi, piatto docce, scarpe è generalmente la più comune. A favorire la presenza di funghi sono le condizioni legate al microclima e all'uso collettivo, ripetuto di bagni, docce, spogliatoi. L'uso di scarpe chiuse e/o di gomma, come anche quello di calzini non traspiranti favorisce la colonizzazione e l'insediamento parassitario dei funghi che possono provocare micosi superficiali e micosi sottocutanee, più invasive delle prime.

Per approfondimenti sull'argomento si rimanda al volume *Rapporti ISTISAN* 07/11.

Sebbene la disciplina sulle piscine non lo preveda, di seguito vengono descritte le procedure per la determinazione di batteri e funghi eventualmente presenti su superfici di impianti acquatici ad uso natatorio e ricreativo.

Nell'eventuale necessità di rilevare la presenza e la concentrazione di microrganismi sulle superfici si possono utilizzare tecniche colturali e morfologiche.

Per una prima valutazione dello stato igienico di una superficie si possono utilizzare i diversi sistemi rapidi, biochimici o chimici, che permettono di rilevare la concentrazione dell'adenosin-tri-fosfato (ATP), molecola ubiquitaria nei microrganismi e nelle cellule animali e vegetali. L'ATP, che interviene come molecola di scambio e di accumulo energetico nelle reazioni enzimatiche, fornisce quindi un indice direttamente proporzionale alla presenza di biomassa microbica.

La metodica biochimica consente una veloce analisi attraverso la lettura del valore della bioluminescenza, rilevata impiegando la reazione luciferina-luciferasi. La biochimica di questa

reazione avviene grazie alla reazione tra l'enzima luciferasi e il suo substrato luciferina e l'ATP. Considerando che una cellula danneggiata o morta non è più in grado di produrre questa molecola e che la quantità residua ancora presente subisce un processo di degradazione, la quantificazione dell'ATP organico può dunque essere un ottimo indice della presenza di cellule viventi.

La reazione di bioluminescenza si attiva con livelli di ATP estremamente bassi. Ciò ha permesso di applicare tale reazione, con opportuni protocolli di preparazione, alla valutazione della presenza microbica in campioni di varia natura e con gradi di contaminazione molto bassa o nulla. L'analisi di bioluminescenza non permette dunque di discriminare né il tipo né la specie di contaminante, ma di fatto può rapidamente dare una valutazione estremamente precisa paragonabile a un test di "conta totale".

In commercio esistono diversi sistemi rapidi, anche portatili, che permettono di effettuare questa misura.

Per una stima quantitativa e qualitativa dei microrganismi presenti sulle superfici vengono utilizzate specifiche tecniche: tamponi, piastre a contatto e spugne, queste tecniche permettono di effettuare le determinazioni attraverso l'utilizzo di terreni selettivi agarizzati.

Di seguito vengono descritte la procedure per l'accertamento delle caratteristiche di qualità delle superfici. Non esistono linee guida, né tantomeno riferimenti normativi che stabiliscano intervalli di valori che permettano di esprimere un giudizio di qualità igienica. Tuttavia, condizioni di buona qualità igienica dovrebbero essere mantenute e controllate nell'ambito delle procedure di autocontrollo (rif. capitolo "Sistema di autocontrollo nelle piscine").

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche ISS Pi 010A rev. 00 e ISS Pi 010B rev. 00 vengono utilizzate per la determinazione di batteri, funghi e dermatofiti su superfici negli impianti natatori.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo ISS Pi 010A rev. 00

2.1.1. Principio del metodo

Metodo di conta per contatto. La metodica prevede l'uso di apposite piastre da contatto, preparate con un terreno di coltura idoneo per il parametro da ricercare. Può essere utilizzata su superfici prive di asperità e non discontinue. Il prelievo viene effettuato poggiando la piastra sulla superficie, mantenendola aderente per alcuni secondi. Dopo incubazione si procede alla conta delle colonie batteriche o fungine cresciute sul terreno agarizzato.

Il metodo non è idoneo per la determinazione di generi e specie patogeni che richiedono fasi di pre-arricchimento e arricchimento.

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

2.1.3. Terreni di coltura e reagenti

Il terreno di coltura da utilizzare deve permettere la crescita dei microrganismi bersaglio.

Per la determinazione dei funghi è possibile utilizzare diversi tipi di terreni agarizzati: Potato Dextrose Agar (PDA), Dichloran Glicerolo (DG18), Yeast Peptone Dextrose Agar (YPD) a formulazione parziale (a base di estratto di lievito, peptone e destrosio), Dichloran Rose Bengal Agar, Malt Extract Agar o Sabouraud Dextrose Agar, ai quali può essere aggiunto cloramfenicolo come agente selettivo per inibire la crescita di batteri concomitanti. Tuttavia di seguito viene riportato il metodo che prevede il solo uso del Sabouraud Dextrose Agar.

Nella preparazione delle piastre con i terreni colturali agarizzati, bisogna avere cura che la superficie del substrato di crescita si presenti leggermente convessa. Se la dispensazione non fosse eseguita correttamente, il campionamento potrebbe essere falsato. Per questo motivo sarebbe preferibile utilizzare piastre da contatto già pronte per l'uso del diametro di 65÷90 mm, contenenti terreni di coltura idonei per diversi parametri.

L'aggiunta di neutralizzanti, quali Lecitina e Tween 80, ai terreni di seguito descritti, può consentire un migliore recupero dei microrganismi, poiché neutralizzano i residui degli eventuali disinfettanti presenti sulle superfici.

2.1.3.1. Agar all'estratto di lievito

Composizione		
Estratto di lievito	3	g
Peptone di caseina	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. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a (121±3)°C per 15 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5±3)°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

2.1.3.2. Sabouraud Dextrose Agar

Composizione		
Peptone micologico	10	g
Destrosio	40	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 5,6±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 la completa solubilizzazione degli ingredienti. Dopo aver sciolto la polvere, sterilizzare a (121±3)°C per 15 minuti. Dopo la sterilizzazione, si consiglia di modificare il pH del terreno ancora in fase liquida con una soluzione di acido lattico sterile al 10% (2.1.3.3.), in modo da ottenere un valore di pH 4,5±0,2. L'abbassamento del pH, favorendo la riduzione della crescita batterica, permette la crescita fungina.

Distribuire in capsule di Petri, lasciare solidificare. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.1.3.3. Soluzione di acido lattico al 10%

Composizione		
Acido lattico	10	mL
Acqua distillata	90	mL

Mettere in un pallone tarato 10 mL di acido lattico e portare a 100 mL con acqua distillata. Sono reperibili in commercio soluzioni a titolo noto.

2.1.3.4. Terreno di base Dermasel Agar

Composizione		
Peptone micologico	10	g
Destrosio	20	g
Agar	14,5	g
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per la completa solubilizzazione degli ingredienti.

2.1.3.5. Soluzione di cicloeximide e cloramfenicolo

Composizione		
Cicloeximide	400	mg
Cloramfenicolo	50	mg
Alcol etilico	6	mL

Sciogliere la cicloeximide e il cloramfenicolo in alcol etilico agitando delicatamente fino a completa soluzione. Il supplemento è disponibile anche in commercio.

Il prodotto è classificato come T – Tossico per la presenza di cicloeximide. È pericoloso per contatto, inalazione e ingestione. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

2.1.3.6. Terreno Dermasel Agar completo

Composizione		
Dermasel Agar	1000	mL
Soluzione di cicloeximide e cloramfenicolo	6	mL
pH 6,9 ±0,2		

Aggiungere ad 1 L di terreno di base (2.1.3.4.) 6 mL di soluzione di cicloeximide e cloramfenicolo (2.1.3.5.). Agitare per ottenere una soluzione omogenea e sterilizzare a (121±3)°C per 10 minuti. Dopo la sterilizzazione distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, a (5±3)°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

2.1.4. Procedura

2.1.4.1. Campionamento

In funzione dei microrganismi da ricercare, selezionare il terreno colturale più adatto. Per la determinazione dei batteri eterotrofi utilizzare due piastre di Agar all'estratto di Lievito (2.1.3.1.); per la determinazione dei funghi utilizzare Sabouraud Dextrose Agar (2.1.3.2.) e per la determinazione dei funghi dermatofiti utilizzare Dermasel Agar (2.1.3.6.).

Assicurarsi che le piastre con il terreno agarizzato siano ben asciutte; in caso contrario, porle aperte sotto cappa fino a completa asciugatura.

Per effettuare il campionamento far aderire il substrato di crescita direttamente alla superficie esercitando una lieve pressione, uniforme e costante sull'intera area, per 10 secondi, eventualmente utilizzare i dispositivi appositi per ottenere pressioni costanti.

La stessa procedura vale per la ricerca di diversi altri microrganismi ambientali o indicatori, potenzialmente riscontrabili sulle superfici.

2.1.4.2. Trasporto dei campioni

Il trasporto dei campioni in laboratorio deve avvenire preferibilmente in condizioni refrigerate.

2.1.4.3. Incubazione

Le piastre, appena giunte in laboratorio, devono essere poste a incubare.

Per il conteggio dei batteri psicrofili incubare le piastre di Agar all'estratto di lievito (2.1.3.1.) alla temperatura di (22±1)°C per 72-96 ore. L'incubazione può essere prolungata fino a 6 giorni.

Per il conteggio dei batteri mesofili, incubare le piastre di Agar all'estratto di lievito (2.1.3.1.) alla temperatura di (36±1)°C per (48÷72) ore.

Per il conteggio dei funghi incubare alla temperatura di (22÷25)°C in incubatore termostato per (3÷5) giorni.

Per il conteggio dei dermatofiti incubare alla temperatura di (25÷30)°C in incubatore termostato, effettuando il primo controllo a 48 ore, prolungando l'incubazione fino a 20 giorni e controllando periodicamente per i ceppi a crescita lenta.

Nel corso del periodo di incubazione è utile procedere, prima della scadenza, a controlli periodici della crescita microbica.

2.1.5. Espressione dei risultati

Il numero dei microrganismi cresciuti sulla superficie dei terreni di coltura, si calcola come UFC per cm^2 :

$$\text{UFC/cm}^2 = \frac{N}{S}$$

dove:

N = numero di colonie contate;

S = superficie in cm^2 della piastra da contatto utilizzata (es. una piastra da contatto del diametro di 65 mm ha una superficie di 33,2 cm^2).

2.2. Metodo ISS Pi 011B rev. 00

2.2.1. Principio del metodo

Metodo di conta con tampone. Questo metodo prevede l'uso di tamponi ed è maggiormente impiegato per prelievi da superfici irregolari, e particolarmente utile per effettuare prelievi da superfici interstiziali difficilmente raggiungibili con la tecnica delle piastre da contatto.

A differenza del metodo delle piastre da contatto (2.1.) il campionamento non è contemporaneo all'inoculo del terreno di crescita, che avverrà successivamente in laboratorio dopo il trasporto in condizioni refrigerate in appositi contenitori.

Il prelievo consiste nello strisciare con tamponi sterili la superficie da saggiare. Per l'analisi si esegue la tecnica dell'inclusione in agar.

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

2.2.3. Terreni di coltura e reagenti

Il terreno di coltura da utilizzare deve permettere la crescita dei microrganismi bersaglio. È opportuno non utilizzare terreni che contengano sostanze selettive.

2.2.3.1. Agar all'estratto di lievito

Composizione		
Estratto di lievito	3	g
Peptone di caseina	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. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a (121±3)°C per 15 minuti. Mantenere il terreno in bagnomaria termostatato a 45÷48°C.

2.2.3.2. Sabouraud Dextrose Agar

Composizione		
Peptone micologico	10	g
Destrosio	40	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 5,6±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 la completa solubilizzazione degli ingredienti. Dopo aver sciolto la polvere, sterilizzare a (121±3)°C per 15 minuti. Dopo la sterilizzazione, si consiglia di modificare il pH del terreno ancora in fase liquida con una soluzione di acido lattico sterile al 10% (2.2.3.3.), in modo da ottenere un valore di pH 4,5±0,2. L'abbassamento del pH favorendo la riduzione della crescita batterica, permette la crescita fungina.

Mantenere il terreno in bagnomaria termostatato a 45÷48°C.

Per garantire una maggiore selettività del metodo, è possibile aggiungere al terreno l'antibiotico cloramfenicolo, secondo le specifiche operative.

2.2.3.3. Soluzione di acido lattico al 10%

Composizione		
Acido lattico	10	mL
Acqua distillata	90	mL

Mettere in un pallone tarato 10 mL di acido lattico e portare a 100 mL con acqua distillata. Sono reperibili in commercio soluzioni a titolo noto.

2.2.3.4. Terreno di base Dermasel Agar

Composizione		
Peptone micologico	10	g
Destrosio	20	g
Agar	14,5	g
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per la completa solubilizzazione degli ingredienti.

2.2.3.5. Soluzione di cicloeximide e cloramfenicolo

Composizione		
Cicloeximide	400	mg
Cloramfenicolo	50	mg
Alcol etilico	6	mL

Sciogliere la cicloeximide e il cloramfenicolo in alcol etilico agitando delicatamente fino a completa soluzione. Il supplemento è disponibile anche in commercio.

Il prodotto è classificato come T – Tossico per la presenza di cicloeximide. È pericoloso per contatto, inalazione e ingestione. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

2.2.3.6. Terreno Dermasel Agar completo

Composizione		
Dermasel Agar	1000	mL
Soluzione di cicloeximide e cloramfenicolo	6	mL
pH 6,9 ±0,2		

Aggiungere ad 1 L di terreno di base (2.2.3.4.) 6 mL di soluzione di cicloeximide e cloramfenicolo (2.2.3.5.). Agitare per ottenere una soluzione omogenea e sterilizzare a (121±3)°C per 10 minuti. Mantenere il terreno in bagnomaria termostatato a 45÷48°C.

2.2.3.7. Soluzione fisiologica tamponata

Composizione		
Cloruro di sodio	8,5	g
Potassio fosfato bibasico anidro	1	g
Potassio fosfato monobasico anidro	3	g
Acqua distillata	1000	mL

Sospendere gli ingredienti in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a 7±0,2. Distribuire in tubi in ragione di 10 mL per tubo e sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per (15±1) minuti. Conservare per non più di un mese in condizioni ottimali.

2.2.3.8. Soluzione salina peptonata

Composizione		
Peptone	1	g
Cloruro di sodio	8,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH finale 7±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere gli ingredienti in acqua distillata. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a 7±0,2. Riscaldare agitando frequentemente. Distribuire in tubi in ragione di 10 mL per tubo e sterilizzare la soluzione in autoclave a (121±3)°C per (15±1) minuti. Conservare a (5±3)°C per non più di 3 mesi in condizioni ottimali.

2.2.4. Procedura

2.2.4.1. Campionamento

Prelevare il tampone sterile dal proprio involucro e inumidirlo con soluzione fisiologica, eliminando il liquido in eccesso ruotandolo sulle pareti del tubo. Applicare il delimitatore di area (sterile o sterilizzato) 10×10 cm (100 cm^2) sulla zona della superficie prescelta e strofinare il tampone sulla superficie delimitata con movimento a zig–zag incrociato. Ripetere l'operazione partendo dagli altri vertici del delimitatore. Trasferire il tampone in un tubo contenente 10 mL di Soluzione fisiologica tamponata (2.2.3.7.) o Soluzione salina peptonata (2.2.3.8.).

2.2.4.2. Eluizione del campione

Per l'eluizione dei microrganismi, sottoporre il tubo contenete il tampone, ad agitazione moderata con vortex per almeno 60 secondi. Eliminare il tampone e conservare la soluzione che a questo punto rappresenta il vero e proprio campione da sottoporre a successiva analisi. Se necessario, prima dell'analisi, procedere a diluizioni seriali decimali del campione.

2.2.4.3. Semina del campione

Prelevare 1 mL di campione tal quale o di una sua diluizione e porlo sul fondo in una capsula Petri da 90 mm. Aggiungere il terreno di coltura specifico per il microrganismo da ricercare mantenuto ad una temperatura di 45÷48°C.

Per la ricerca dei batteri eterotrofi utilizzare il terreno Agar all'estratto di Lievito (2.2.3.1.), utilizzando due diverse piastre che successivamente saranno incubate a due diverse temperature.

Per la ricerca dei funghi utilizzare Sabouraud Dextrose Agar (2.2.3.2.).

Per la determinazione dei funghi dermatofiti utilizzare Dermasel Agar (2.2.3.6.).
Prima di incubare, lasciare raffreddare e solidificare il terreno a temperatura ambiente.

2.2.4.4. Incubazione

Per il conteggio dei batteri psicrofili, incubare le piastre di Agar all'estratto di lievito alla temperatura di (22±1)°C per 72-96 ore; l'incubazione può essere prolungata fino a 6 giorni.

Per il conteggio dei batteri mesofili, incubare le piastre di Agar all'estratto di lievito alla temperatura di (36±1)°C per (48÷72) ore.

Per il conteggio dei funghi incubare alla temperatura di (22÷25)°C in incubatore termostato per (3÷5) giorni.

Per il conteggio dei dermatofiti incubare alla temperatura di (25÷30)°C in incubatore termostato, effettuando il primo controllo a 48 ore, prolungando l'incubazione fino a 20 giorni e controllando periodicamente per i ceppi a crescita lenta.

2.2.5. Espressione dei risultati

Il numero dei microrganismi cresciuti nei terreni di coltura, si calcola come UFC per cm^2:

$$UFC/cm^2 = \frac{N \times V \times D}{100}$$

dove:

N = numero di colonie contate;
V = volume di soluzione eluente utilizzata.
D = fattore di diluizione
100 = superficie tamponata corrispondente 10 × 10 cm

Bibliografia di riferimento

Bonadonna L, Donati G. *Piscine ad uso natatorio: aspetti igienico-sanitari e gestionali per l'applicazione della nuova normativa*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/11).

Bouillard L, Michel O, Dramaix M, Devleeschouwer M. Bacterial contamination of indoor air, surfaces and settled dust and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings. *Ann agric environ med* 2005;12(2):187-192.

APPENDICE A
Attrezzature di base per le analisi microbiologiche delle acque

Introduzione

Le indagini microbiologiche presuppongono l'uso di specifiche dotazioni e attrezzature di laboratorio. Di seguito vengono descritti alcuni dispositivi e apparecchiature di uso più comune nei laboratori per l'analisi microbiologica delle acque.

Per l'esecuzione di prove microbiologiche su acque di piscina è opportuno seguire procedure idonee, dettagliate di seguito e riferite alle prescrizioni di carattere generale riportate nella norma UNI 10674.

Per l'organizzazione di un laboratorio di microbiologia è comunque necessario attenersi a quanto definito dal DL.vo 81/2008 e s.m.i. che così stabilisce: "il datore di lavoro adotta idonee misure di contenimento in conformità all'Allegato XLVII".

Per ottenere elevati standard di sicurezza e prevenzione per coloro che lavorano in laboratorio è necessario che gli operatori siano comunque adeguatamente informati sui rischi e sulle corrette modalità di utilizzo delle apparecchiature presenti nel laboratorio, nonché sulle modalità di manipolazione di matrici di diversa natura, sull'uso delle cappe *biohazard* e dei dispositivi di protezione individuale. È opportuno anche pianificare un sistema che preveda lo svolgimento di attività di formazione per l'acquisizione delle conoscenze e delle capacità sull'attuale normativa in materia di prevenzione dei rischi derivanti dall'uso di sostanze chimiche, di agenti fisici e di agenti biologici in ambiente laboratoristico, sulle metodologie di valutazione del rischio, sull'uso e sul corretto impiego dei dispositivi di protezione individuale e sulla gestione delle emergenze.

In considerazione del gruppo di appartenenza degli agenti biologici con cui si opera (gruppo 2, 3, 4), per uso deliberato o per esposizione potenziale, agli operatori dei laboratori devono essere garantite dal datore di lavoro misure idonee e livelli di contenimento conformi a quanto indicato nell'Allegato XLVII del DL.vo 81/2008 e s.m.i., fatto salvo quanto specificatamente previsto dall'Allegato XLVI, punto 6.

Pertanto, le caratteristiche strutturali per i laboratori di base, dove vi è uso di materiali con possibile contaminazione da agenti patogeni per l'uomo, devono essere tali da assicurare spazi interni tali da garantire gli spostamenti e le attività in sicurezza, evitando possibili scontri accidentali contro le apparecchiature o tra gli operatori. Quindi, prima dell'acquisto di qualsiasi apparecchiatura per il laboratorio è necessario sia definito, all'interno dei locali, il posizionamento della strumentazione da acquistare. Dovrà essere quindi valutato che lo spazio e la collocazione assegnati allo strumento siano idonei per l'esecuzione delle Procedure Operative Standard; le condizioni ambientali (temperatura, umidità, insolazione) e al contorno (es. presenza di vibrazioni) siano adeguate e siano rispettate le norme di sicurezza sia in rapporto ad eventuali rischi ambientali (diffusione di bioaerosol e polveri, di sostanze tossiche), sia in relazione alle strutture e agli impianti.

Quando si eseguono analisi microbiologiche per le acque, è di particolare importanza che siano isolati o enumerati solo i microrganismi presenti nei campioni e che essi non contaminino l'ambiente.

Per conseguire questo obiettivo è necessario dedicare attenzione all'igiene personale e utilizzare tecniche di lavoro che garantiscano, per quanto possibile, l'esclusione di contaminazioni esterne. Pertanto, nel presente capitolo è possibile fornire solo alcuni esempi delle precauzioni da assumere durante lo svolgimento di esami microbiologici.

Per eseguire analisi microbiologiche è necessaria una conoscenza completa delle tecniche microbiologiche e dei microrganismi interessati. È importante che le analisi siano condotte con la maggiore accuratezza possibile, il calcolo del numero di microrganismi ricercati sia eseguito conformemente alla tecnica e al microrganismo da determinare e che sia garantita la buona riproducibilità dei risultati.

Di seguito vengono descritte alcune tra le principali attrezzature per la preparazione, sterilizzazione e conservazione dei terreni colturali e le procedure generali per il controllo delle apparecchiature.

Generalità

Le apparecchiature di prova in dotazione ad un laboratorio di microbiologia devono garantire affidabilità di funzionamento e di risposta in modo da non alterare l'accuratezza e la precisione del risultato finale della prova. Pertanto dovranno essere sempre tenute in perfetta efficienza e installate in

locali che garantiscano una adeguata protezione dal deterioramento; l'efficienza dovrà essere garantita con opportune procedure per la manutenzione e la taratura.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Apparecchi per sterilizzazione

Autoclavi

La sterilizzazione a vapore saturo sotto pressione (per terreni di coltura, bottiglie da prelievo, attrezzature filtranti, eventualmente rifiuti infetti, ecc.) richiede l'impiego di autoclavi di capacità adeguate al materiale da sterilizzare che non dovrà essere eccessivamente ammassato. Non utilizzare l'autoclave per sterilizzare materiali puliti e decontaminare materiali usati contemporaneamente. La

sterilizzazione di norma si effettua alla temperatura di (121±3)°C con una atmosfera di pressione per un tempo di (15÷20) minuti.

Per il corretto uso dell'autoclave attenersi scrupolosamente alle indicazioni del costruttore e prevedere l'esecuzione di controlli periodici da parte di ditte specializzate.

Lampade a raggi ultravioletti

I sistemi di sterilizzazione con raggi ultravioletti (UV) sono particolarmente idonei per la sterilizzazione dell'ambiente sotto cappa o per piccoli locali. È da tenere presente che la vita media di una lampada a UV è di circa 5000 ore e che comunque è necessario effettuare, per mantenerne l'efficacia, una sua manutenzione periodica (pulizia con eliminazione della polvere, ecc.).

Per l'individuazione di alcuni microrganismi cresciuti in brodi o terreni di coltura si ricorre, in alcuni casi, all'uso di una speciale lampada a raggi ultravioletti, la lampada di Wood, che permette di evidenziare la presenza dei microrganismi specifici che, ad una determinata lunghezza d'onda, fluorescono.

L'uso di lampade a raggi ultravioletti richiede precauzioni particolari per evitare danni agli occhi e alla pelle degli operatori (usare DPI).

Stufe a secco

Le stufe devono consentire il raggiungimento della temperatura di (170±10)°C per circa 2 ore. È necessario che siano corredate di un termometro a gambo lungo, di precisione accettabile nell'intervallo fra 160°C e 180°C e di un idoneo sistema di termoregolazione. È altresì opportuno che siano fornite di un sistema di interruttore a tempo che consenta di programmare il tempo di sterilizzazione. Per il corretto uso delle stufe attenersi scrupolosamente alle indicazioni del costruttore e prevedere l'esecuzione di controlli periodici da parte di ditte specializzate.

Apparecchiature per la misura del pH

Il pH dei terreni di coltura e delle soluzioni può essere determinato per via potenziometrica con l'uso di piaccametri che devono avere una precisione di misura di ±0,2 unità di pH a 20°C e la sua soglia di misurazione minima deve essere 0,01 unità di pH.

La determinazione per via colorimetrica dovrebbe essere evitata perché fornisce risultati poco precisi.

Attrezzature per l'incubazione

Armadi termostatici, camere termostatiche e termostati

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata e assicurare nei vari comparti una temperatura costante, entro limiti di variazione non eccedenti±1°C. Sono preferibili gli armadi termostatici a camicia d'acqua. Sia gli armadi termostatici che le camere termostatiche e i termostati dovranno essere muniti di un doppio sistema di termoregolazione, uno per il mantenimento della temperatura di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura lievemente superiore (temperatura massima di sicurezza) che non dovrà mai essere superata.

Di norma vengono utilizzati incubatori regolabili, a temperatura variabile, da quella ambiente a 80°C. Per temperature intorno ai 20°C sono comunque da utilizzare frigotermostati. Essi devono garantire la temperatura di incubazione prevista dal metodo analitico.

È opportuno che queste apparecchiature siano provviste inoltre di termometri per il controllo visivo della temperatura, con una scala che consenta la lettura di 1°C, o di un display e, possibilmente, di un sistema termometrico di registrazione.

Gli armadi termostatici di notevoli dimensioni e le camere termostatiche dovranno essere muniti di un idoneo sistema di circolazione dell'aria che consenta il mantenimento della temperatura richiesta in tutti i punti del vano.

È altresì opportuno che queste apparecchiature siano dotate di un sistema che consenta il mantenimento di un livello di umidità compreso fra il 75 e l'80%. Ciò può essere ottenuto anche con un recipiente contenente acqua, collocato sul fondo.

Il materiale posto ad incubare dovrà essere disposto in modo da consentire la circolazione della temperatura e non essere eccessivamente ammassato.

Bagni termostatici

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata ed essere provvisti di un doppio sistema di controllo della temperatura costituito da un sistema di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura superiore (temperatura di sicurezza) che non dovrà mai essere superata. Dovranno inoltre essere provvisti di termometri per il controllo visivo della temperatura e possibilmente di un sistema termometrico di registrazione ed eventualmente di un idoneo sistema di agitazione dell'acqua. Per il loro riempimento è necessario utilizzare acqua distillata che deve essere comunque rinnovata regolarmente. Per evitare fenomeni di corrosione è opportuno utilizzare filiere o idonei cestelli di acciaio inossidabile o di materiale plastico idoneo. L'eventuale sviluppo di alghe o di funghi nell'acqua deve essere eliminato mediante l'uso di composti ammonici quaternari da fare agire per circa 24 ore, provvedendo poi allo svuotamento, risciacquo e successivo riempimento con acqua distillata.

Bilance

In laboratori attrezzati per l'esecuzione di indagini microbiologiche può essere sufficiente disporre di bilance che permettono di pesare quantità intorno a 150 g con sensibilità di 0,1 g.

Per la pesata di additivi, reagenti, coloranti ecc., è necessario disporre di bilance analitiche con una sensibilità di 0,1 mg. Le bilance devono essere sottoposte a taratura periodica.

Cappe per la sicurezza biologica

La maggior parte delle attività di laboratorio, quali la miscelazione, la sonicazione, la frantumazione, l'agitazione, lo scuotimento di materiale infetto, come anche l'isolamento da brodi di coltura, possono inavvertitamente generare bioaerosol pericolosi la cui formazione e dispersione deve essere ridotta al minimo.

È pertanto buona norma, per garantire la qualità del dato analitico e la protezione dell'operatore, eseguire queste operazioni in una cappa di sicurezza biologica di tipo appropriato.

Esistono tre tipi di cappe di sicurezza biologica: classe I, II, e III (Tabella A1). La loro efficacia dipende dal flusso dell'aria, dalla capacità di contenimento, dall'integrità dei filtri HEPA (*High Efficiency Particulate Air filter*) e, nel caso delle cappe I e II, dalla loro posizione nella stanza in relazione alle correnti di aria e ai movimenti del personale (vanno poste lontano dalle zone di passaggio e da correnti d'aria provenienti da porte, finestre e dall'impianto di aerazione).

Di norma, per eseguire analisi microbiologiche ambientali che prevedano la ricerca di microrganismi a rischio basso o moderato (gruppi di rischio 1 e 2) vengono utilizzate cappe a flusso laminare di classe I o II.

Tabella A1. Caratteristiche delle cappe per la sicurezza biologica

Classe	% aria in ricircolo	Caratteristiche	Impieghi	Protezione		
				operatore	ambiente	campione
I		apertura frontale, aria esterna dall'apertura frontale, filtro HEPA sull'aria in uscita	basso rischio; microrganismi di gruppo 1-2	buona	ottima	scarsa
II A	70	apertura frontale con ingresso dell'aria, flusso laminare verticale, filtro HEPA sull'aria in ingresso e uscita, se sostanze mutagene, cancerogene, radioattive l'aria espulsa deve essere convogliata all'esterno	medio rischio; microrganismi di gruppo 2-3	buona	ottima	ottima
II B 1	30					
II B 2	0					
III		chiusura ermetica, a pressione negativa, accesso consentito da guanti; filtro HEPA sull'aria in ingresso, doppio filtro HEPA sull'aria in uscita	alto rischio; microrganismi di gruppo 4	ottima	ottima	buona

La cappa di sicurezza biologica classe I è una cappa ventilata aperta frontalmente progettata per la protezione dell'operatore, tramite un flusso d'aria entrante che non viene rimandata in circolo. Non proteggono dalla contaminazione i materiali all'interno della cappa (la sterilità non è quindi garantita). È dotata di un filtro HEPA allo scarico per proteggere l'ambiente dalla fuoriuscita di microrganismi.

La cappa di sicurezza biologica classe II è una cappa ventilata aperta frontalmente progettata per la protezione dell'operatore, dei prodotti al suo interno e dell'ambiente circostante. Il flusso laminare è comune a tutte le cappe di classe II mentre in base alla percentuale di aria riciclata e alla velocità dell'aria le cappe di classe II sono suddivise in diversi tipi. Questi tipi di cappa sono utilizzabili per eseguire analisi microbiologiche ambientali che prevedano la ricerca di microrganismi a rischio medio (gruppi di rischio 2 e 3). È caratterizzata da un flusso d'aria in ingresso e con filtrazione sia dell'aria aspirata sia di quella espulsa: il flusso laminare, proveniente dal filtro HEPA, scende perpendicolarmente al piano di lavoro evitando di investire l'operatore, l'aria espulsa deve essere filtrata da un secondo filtro HEPA e, se ricircolata nello stesso locale, da un filtro supplementare a carbone attivo posto a valle del filtro HEPA, per trattenere eventuali frazioni gassose.

Esistono anche cappe di sicurezza biologica classe III, ventilate e totalmente chiuse, a tenuta d'aria e pressione negativa. L'aria in ingresso passa per un filtro HEPA e quella in uscita passa per due filtri HEPA posti in serie. L'attività analitica all'interno di essa viene svolta con guanti a manica in gomma attaccati alla cappa. Sono usate per lavorare con agenti biologici ad alto rischio (gruppo di rischio 4) e forniscono una barriera totale tra l'operatore e il lavoro. Nelle cappe classe III non vanno usati gas infiammabili.

Le cappe di sicurezza biologica non proteggono le mani dell'operatore in caso di versamenti, punture, tagli o cattiva tecnica di lavoro.

Centrifughe e frigoriferi

Possono essere utilizzate centrifughe da banco e da terra con rotori ad inclinazione fissa o variabile. Possono essere refrigerate o meno in base alle necessità. È necessario utilizzare centrifughe realizzate secondo le norme di sicurezza internazionali e con marchio CE.

Frigoriferi e congelatori devono avere un dispositivo di rilevazione della temperatura e impiegare per il controllo interno un termometro a minima e a massima oppure un termometro con bulbo immerso in glicerolo.

I frigoriferi devono assicurare una temperatura di (5±3)°C e i congelatori da utilizzare possono essere quelli che raggiungono temperature di (–20±3)°C e (–70±3)°C.

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

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

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

Devono essere effettuate con cadenza periodica le operazioni che prevedano:

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

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

Membrane filtranti e apparecchiature per filtrazione

Membrane filtranti

Le membrane filtranti per uso batteriologico sono generalmente costituite da dischi di esteri di cellulosa con pori uniformemente distribuiti; sono comunque utilizzate, per situazioni particolari, anche membrane di nylon e policarbonato. Generalmente per le analisi microbiologiche si utilizzano membrane con pori aventi un diametro nominale di 0,45 μm (± 0,02 μm) (pori simmetrici da 0,45 μm oppure pori asimmetrici da 0,7/0,2 μm). Le membrane, a causa della loro porosità hanno la capacità di trattenere sulla loro superficie, all'atto della filtrazione, i batteri contenuti nell'acqua che svilupperanno colonie sulla superficie di una membrana posta su terreno colturale; dopo un idoneo periodo di incubazione, per passaggio per capillarità dei principi contenuti nel terreno, da campioni positivi, si sviluppano colonie visibili.

Esistono in commercio membrane filtranti di vario diametro. Per l'esame batteriologico delle acque vengono normalmente utilizzate membrane del diametro di 47-50 mm.

In commercio si trovano confezioni già sterili pronte per l'uso, in genere sterilizzate con raggi gamma o con ossido di etilene.

Pur possedendo caratteristiche simili, le membrane possono differenziarsi a seconda della ditta di produzione. Problemi si possono verificare in relazione al tipo di membrane utilizzate: inibizione batterica o crescita in corrispondenza della linea del reticolo, sciamatura delle colonie, presenza di zone idrofobiche. Per evitare, pertanto, l'uso di membrane non idonee, sarebbe consigliabile verificarne l'efficienza prima delle analisi.

Apparecchiature per la filtrazione

Nel caso dell'esame batteriologico delle acque, vengono di norma utilizzate apparecchiature idonee per la filtrazione di volumi ridotti (10-100 mL) per i controlli di routine. Dette apparecchiature devono essere adatte per l'impiego di membrane filtranti del diametro di 47-50 mm. Sono costituite da una rampa con supporti e contenitori che possono essere in acciaio inossidabile, vetro, policarbonato o polipropilene. Possono essere impiegate apparecchiature singole o in serie, utilizzando, come sistema aspirante, una

pompa da vuoto azionata elettricamente o una pompa ad acqua. Fra sistema filtrante e sistema aspirante può essere interposto un idoneo sistema per la raccolta dell'acqua filtrata.

I supporti e i contenitori devono essere sterilizzati in autoclave a (121±3)°C per 15 minuti, dopo accurato lavaggio e asciugatura e prima della sterilizzazione devono essere avvolti in carta idonea per mantenere la sterilità durante la conservazione prima dell'uso. Possono essere utilizzati entro due settimane dalla sterilizzazione, se conservati in condizioni ottimali.

Apparecchiature per il supporto di membrane di diametro più grande (ad esempio, 120 mm), in genere di acciaio inossidabile, sono utilizzate per filtrazioni di volumi maggiori di acqua.

Microscopi

Per le normali procedure di analisi microbiologica (es. colorazione di Gram) è sufficiente disporre di un microscopio ottico con obiettivi 10, 40 e 100x, vetrini portaoggetti e coprioggetti e olio ad immersione. Dopo ogni utilizzo rimuovere il residuo di olio sulle lenti con carta ottica. Quando non in uso, il microscopio va tenuto coperto e al riparo dalla luce, per evitare danni alle lenti.

Microscopi con caratteristiche particolari (a epifluorescenza, stereomicroscopio) possono essere utilizzati per specifiche attività analitiche.

È opportuno collocare i microscopi in posizione stabile. Per il microscopio ottico si consiglia la dotazione di un sistema per l'osservazione in contrasto di fase e di una serie di obiettivi, in modo da coprire un intervallo di ingrandimenti sufficientemente elevato, e di sistemi per la regolazione dell'intensità luminosa.

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

Incubatori in atmosfera modificata

Consistono in giare, incubatori, cappe o altri sistemi a tenuta, idonei a creare aree a composizione gassosa controllata. Le condizioni di anaerobiosi devono essere verificate con appositi dispositivi.

Per incubare in anaerobiosi o in microaerofilia in giara si usano generalmente contenitori con guarnizione in cui l'atmosfera viene creata con particolari prodotti chimici che, una volta attivati con l'acqua, producono idrogeno in quantità sufficiente per abbassare il livello di ossigeno nelle giare al di sotto dell'1% v/v. Queste sostanze generano anche anidride carbonica alla concentrazione di 5-8% nella giara e questo fattore migliora la crescita di molti anaerobi.

Per il corretto uso di queste apparecchiature attenersi scrupolosamente alle indicazioni della ditta produttrice.

Termometri

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

Vetreria e materiale monouso

È da preferire la vetreria fabbricata con vetro neutro, resistente alle temperature di sterilizzazione. Prima della sterilizzazione – da effettuare con calore secco alla temperatura di (180±3)°C per 30 minuti o con calore umido a (121±3)°C per 15 minuti – la vetreria deve essere accuratamente lavata in modo da assicurare la completa eliminazione di residui organici o di sostanze che possono esplicare azione antibatterica. Per il controllo della sterilizzazione utilizzare prodotti specifici: indicatori biologici o integratori chimico-fisici per la verifica della sterilizzazione a calore umido e indicatori biologici per la verifica della sterilizzazione a calore secco.

Dopo lavaggio e asciugatura la vetreria, per essere sterilizzata, deve essere confezionata in modo idoneo a consentire il mantenimento della sterilità durante la conservazione.

Negli ultimi anni si è andato sempre più diffondendo l'uso di materiali plastici monouso, forniti in confezioni già sterili. Il vantaggio di usare questi materiali è legato soprattutto al risparmio di manodopera impiegata nelle lunghe procedure di lavaggio, confezionamento e sterilizzazione dei materiali in vetro. I materiali plastici da usare nel laboratorio batteriologico devono però essere esenti da residui tossici della lavorazione, essere trasparenti e avere segni di calibrazione che corrispondano a precise indicazioni volumetriche.

Esistono in commercio anche articoli in materiale plastico che possono essere utilizzati e sottoposti a ripetute sterilizzazioni in autoclave.

Bottiglie per il prelievo

Possono essere di vetro neutro, resistenti alla sterilizzazione, da chiudere con tappo smerigliato o con idoneo tappo a vite. Prima della sterilizzazione, le bottiglie con tappo smerigliato debbono essere provviste di un cappuccio di copertura in carta resistente e impermeabile o in foglio di alluminio. Tale tipo di protezione non è richiesto per le bottiglie munite di tappo a vite.

Per il campionamento possono essere anche utilizzate bottiglie monouso in materiale plastico, disponibili in commercio già sterili, in genere in confezioni multiple.

Per i prelievi in vasca, sotto il livello dell'acqua, utilizzare contenitori sterili anche all'esterno.

Bottiglie e tubi per diluizione, beute, cilindri tarati

È da utilizzare preferibilmente materiale in vetro, resistente alla sterilizzazione.

Le bottiglie e i tubi per diluizione dovranno essere provvisti di tappo smerigliato, a scatto, di gomma o a vite. Possono essere impiegate anche bottiglie (o tubi) di plastica, fabbricate con materiale idoneo e non tossico, anche resistenti alla sterilizzazione in autoclave.

Pipette e micropipette

Per le varie operazioni di analisi possono occorrere pipette di varia capacità (da 1, da 5 e da 10 mL), graduate fino alla punta, con suddivisione a 0,1 mL.

L'uso di pipette di vetro riutilizzabili munite di filtro di cotone grezzo all'estremità superiore è stato superato da quello di pipette di materiale plastico.

Sono disponibili in commercio confezioni di pipette monouso in materiale plastico, di varia misura, già sterili. Per volumi più piccoli possono essere comunque utilizzate micropipette manuali, elettroniche, monocanale o multicanale da utilizzarsi con appositi puntali monouso.

Per la sicurezza dell'operatore è necessario non pipettare con la bocca, ma utilizzare sempre pipettatrici automatiche o sistemi di aspirazione tipo pompette aspiranti a bulbo di gomma.

Tubi per coltura

I tubi possono essere usati per la tecnica dei tubi multipli, per l'esecuzione di test biochimici, per la conservazione di colture batteriche, ecc. Si utilizzano tubi di diverse dimensioni in relazione all'utilizzo. I tubi devono essere chiusi utilizzando preferibilmente tappi in metallo, in materiale plastico o in cotone grezzo. Sono decisamente da preferire i tubi in vetro resistente alla corrosione e alla sterilizzazione; tubi o provette monouso sono consigliabili per l'esecuzione di tecniche molecolari.

Capsule di Petri

Capsule di Petri in vetro sono state usate per lungo tempo in batteriologia. Negli ultimi anni esse sono state quasi totalmente sostituite da piastre monouso, in materiale plastico che si trovano in commercio già sterili in confezioni sigillate.

L'uso delle capsule di Petri è indispensabile per l'isolamento di colture batteriche e per l'analisi effettuata con la tecnica della filtrazione su membrana. Vengono utilizzate capsule di Petri di varie dimensioni. Il tipo più diffuso ha un diametro di circa 100 mm e un'altezza di 15 mm. Per la filtrazione dell'acqua, poiché la tecnica standardizzata prevede l'utilizzo di membrane di 47 mm di diametro, si possono usare capsule di diametro anche di 50 mm e dello spessore di 12 mm.

Indipendentemente dal materiale (vetro o plastica) le capsule di Petri devono essere con il fondo perfettamente piano e perfettamente trasparenti al fine di rendere ottimale il riconoscimento delle colonie.

Bibliografia di riferimento

American Public Health Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd ed.* Washington, DC: APHA; 2012.

Italia. Decreto legislativo 9 aprile 2008, n. 81. *Gazzetta Ufficiale* n. 101 del 30 aprile 2008 - Suppl. Ordinario n. 108.

UNI 10674. *Acque destinate al consumo umano. Guida generale per le determinazioni microbiologiche.* Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.

APPENDICE B
MPN: tabella per il calcolo

Tabella MPN Quanti-Tray® a 51 pozzetti

N. di pozzetti positivi in un campione da 100 mL	Numero più probabile	Intervallo di confidenza del 95%	
		Inferiore	Superiore
0	**<1**	0,0	3,7
1	**1,0**	0,3	5,6
2	**2,0**	0,6	7,3
3	**3,1**	1,1	9,0
4	**4,2**	1,7	10,7
5	**5,3**	2,3	12,3
6	**6,4**	3,0	13,9
7	**7,5**	3,7	15,5
8	**8,7**	4,5	17,1
9	**9,9**	5,3	18,8
10	**11,1**	6,1	20,5
11	**12,4**	7,0	22,1
12	**13,7**	7,9	23,9
13	**15,0**	8,8	25,7
14	**16,4**	9,8	27,5
15	**17,8**	10,8	29,4
16	**19,2**	11,9	31,3
17	**20,7**	13,0	33,3
18	**22,2**	14,1	35,2
19	**23,8**	15,3	37,3
20	**25,4**	16,5	39,4
21	**27,1**	17,7	41,6
22	**28,8**	19,0	43,9
23	**30,6**	20,4	46,3
24	**32,4**	21,8	48,7
25	**34,4**	23,3	51,2
26	**36,4**	24,7	53,9
27	**38,4**	26,4	56,6
28	**40,6**	28,0	59,5
29	**42,9**	29,7	62,5
30	**45,3**	31,5	65,6
31	**47,8**	33,4	69,0
32	**50,4**	35,4	72,5
33	**53,1**	37,5	76,2
34	**56,0**	39,7	80,1
35	**59,1**	42,0	84,4
36	**62,4**	44,6	88,8
37	**65,9**	47,2	93,7
38	**69,7**	50,0	99,0
39	**73,8**	53,1	104,8
40	**78,2**	56,4	111,2
41	**83,1**	59,9	118,3
42	**88,5**	63,9	126,2
43	**94,5**	68,2	135,4
44	**101,3**	73,1	146,0
45	**109,1**	78,6	158,7
46	**118,4**	85,0	174,5
47	**129,8**	92,7	195,0
48	**144,5**	102,3	224,1
49	**165,2**	115,2	272,2
50	**200,5**	135,8	387,6
51	**>200,5**	146,1	infinito

APPENDICE C
Piscine naturali

Le piscine naturali sono anche denominate“biopiscine” o “laghetti naturali balneabili”.

Si tratta di invasi artificiali, impermeabilizzati rispetto al suolo, realizzati con varie soluzioni edilizie. Sono caratterizzate dall’assenza di trattamenti di disinfezione di tipo chimico (es. clorazione) o fisico (es. UV).

Al momento attuale, in Italia non esiste un regolamento, o altrimenti delle linee guida, che disciplini l’utilizzo di piscine naturali ad uso pubblico. In assenza di un documento ufficiale e condiviso diventa quindi difficile controllare la qualità igienico-sanitaria e ottenere autorizzazioni alla balneazione in impianti con queste specifiche caratteristiche.

Tuttavia, l’utilità di linee guida concordate e di controlli costanti è dimostrata dai test compiuti, in oltre 10 anni di monitoraggio, dall’Agenzia provinciale per l’Ambiente della Provincia di Bolzano sui 7 impianti pubblici dislocati sul territorio.

Un’esperienza che ha portato all’elaborazione, con la Deliberazione della Giunta provinciale n. 974 del 20 giugno 2011, delle “Linee guida sulle caratteristiche di qualità, la vigilanza e la gestione della piscine naturali pubbliche” che stabiliscono i requisiti microbiologici e chimici dell’acqua in vasca e i controlli da eseguire sull’impianto.

È stata inoltre elaborata una bozza di linee guida europee, nata dall’esperienza, dalle raccomandazioni e dalle leggi esistenti in diversi Paesi e armonizzate all’interno dell’*International Organization for Natural Bathing Water* (IOB). Sono stati quindi proposti valori limite per la qualità dell’acqua, sia microbiologici sia chimici, basati sull’esperienza di impianti pubblici e sulle normative attualmente in vigore in diversi Paesi europei. Nelle linee guida, per il controllo dell’acqua nell’area balneabile, è stata prevista la ricerca di *Escherichia coli*, Enterococchi e *Pseudomonas aeruginosa*. Diversi sono i componenti chimici la cui concentrazione può essere messa in correlazione con la crescita del fitoplancton; quindi sono previsti parametri chimici per il controllo dell’acqua di riempimento e dell’acqua dell’area balneabile. Le linee guida prevedono anche aspetti legati alle attività di gestione degli impianti anche in relazione alle non conformità ai valori stabiliti.

In Tabella C1 sono riportati i valori limite stabiliti dai regolamenti di alcuni paesi, oltre che quelli inseriti nella delibera della Provincia Autonoma di Bolzano.

Tabella C1. Valori limite microbiologici stabiliti da regolamenti di alcuni Paesi europei

Parametro (UFC/100 mL)	Austria	Italia (Bolzano)	IOB	Germania	Svizzera (Argovia)
documento	**BHygV (2012)**	**Delib. 974 (2011)**	**Linee guida (2011)**	**FLL (2011)**	**Bäv (2001)**
E. coli	max. 100	max. 100	max.100	max. 100	max. 100
Enterococchi	max. 50	max. 50	max.50	max. 50	max. 50
P. aeruginosa	max. 25	max. 10	max. 50	max. 10	max. 10

BHygV: Bäderhygieneverordnung. 2012
Delib. 974: Deliberazione della Giunta Provinciale della Provincia Autonoma di Bolzano del 20 giugno 2011, n. 974 (Linee guida sulle caratteristiche di qualità dell’acqua, la vigilanza e la gestione delle piscine naturali pubbliche) pubblicata su *Bollettino ufficiale* n. 28 del 12 luglio 2011
FLL: linee guida del Forschungsgesellaschaft Landschaftsentwicklung Landascahftabau, 2011
IOB: linee guida dell’International Organization for natural Bathing waters, 2011

Stampato da Ugo Quintily SpA
Viale Enrico Ortolani 149/151, 00125 Roma

Roma, ottobre-dicembre 2013 (n. 4) 32° Suppl.