

EDITORIALE

Dato l'interesse per tecniche di indagine rapide ed efficienti per l'identificazione e l'enumerazione di microrganismi nell'ambiente, questo numero del Notiziario è dedicato interamente alla presentazione di metodologie che vengono attualmente utilizzate per la caratterizzazione dei microrganismi nell'ecosistema acquatico. In particolare vengono illustrate, contemporaneamente a tecniche tradizionali, nuove metodiche di indagine basate su tecniche di biologia molecolare, che sono utilizzate con sempre maggiore frequenza per la caratterizzazione microbiologica delle acque. Quest'ultime sono state introdotte nell'arco degli ultimi anni e sono caratterizzate da una rapida evoluzione in termini di facilità di utilizzo, rapidità della risposta e potenzialità di applicazione. E' presumibile che l'interesse ad utilizzare queste metodiche sia oggi maggiore nei laboratori scientifici, ma è ragionevole prevedere una più ampia diffusione nel futuro anche prossimo.

Le due metodologie molecolari presentate riguardano l'analisi FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) e la PCR (Polymerase Chain Reaction): entrambe permettono di identificare e quantificare microrganismi sulla base di sequenze geniche specifiche e consentono talvolta, con particolari accorgimenti, di ricavare informazioni anche sulla loro vitalità. Tali metodologie sono indicate in particolare per la ricerca di microrganismi in campo ambientale in quanto permettono di superare le difficoltà connesse alla loro coltivabilità ed isolamento; come è noto questo rappresenta l'ostacolo principale nei sistemi di rilevazione tradizionali. Il vantaggio comune di entrambe le metodologie risiede soprattutto nella rapidità della risposta, che si ottiene nell'arco di poche ore, rispetto alle metodiche di caratterizzazione tradizionale che richiedono tempi più lunghi. Inoltre, per quanto riguarda la FISH, questa tecnica garantisce la specificità dell'identificazione e la possibilità di valutare in situ la presenza del microrganismo di interesse mentre la PCR, oltre ad offrire una identificazione certa perché effettuata su base molecolare, permette anche il rilevamento di microrganismi presenti in esigue quantità.

In questo numero viene inoltre presentata una metodologia analitica proposta dall'EPA per il rilevamento dei protozoi parassiti appartenenti ai generi *Cryptosporidium* e *Giardia*, responsabili di gastroenteriti nell'uomo, e un contributo relativo ai metodi culturali rapidi per la ricerca di enterococchi fecali nell'ambiente idrico.

Prof. Roberto Passino

Direttore dell'Istituto di Ricerca sulle Acque

Roma, settembre 2002

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE *IN SITU* DI BIOMASSE MISTE MEDIANTE SONDE MOLECOLARI FLUORESCENTI

a cura di S. Rossetti e V. Tandoi - Irsa - Cnr, Roma

Riassunto

In tutti i settori dell'ecologia ambientale sono ormai a disposizione dei nuovi strumenti per identificare i microrganismi all'interno di biomasse miste. Una delle tecniche maggiormente utilizzate per monitorare le dinamiche di popolazioni microbiche nell'ambiente e' rappresentato dalla tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Quest'ultima permette di identificare *in situ* la presenza di un'ampia varietà di microrganismi prescindendo dall'isolamento in coltura pura che spesso risulta difficoltoso o inattuabile. Oltre al protocollo di utilizzo della tecnica FISH viene presentato un esempio di applicazione di tale metodologia per l'identificazione di microrganismi coinvolti nei principali fenomeni biologici che intervengono negli impianti di trattamento a fanghi attivi.

Summary

New molecular methodologies are now available for the identification of microorganisms present in mixed biomass. One of the more diffused techniques is represented by FISH (Fluorescence in situ Hybridization) which permits the *in situ* identification of a wide range of microorganisms avoiding the isolation in pure culture. The FISH protocol and the use of this technique for the identification of the main bacterial groups present in activated sludge treatment plants, will be presented.

INDICE

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE <i>IN SITU</i> DI BIOMASSE MISTE MEDIANTE SONDE MOLECOLARI FLUORESCENTI	1
LE APPLICAZIONI DELLA "POLYMERASE CHAIN REACTION" (PCR) ALLA RICERCA DI MICRORGANISMI DI INTERESSE MEDICO NEI CAMPIONI AMBIENTALI	7
CISTI DI <i>GIARDIA</i> E OOCISTI DI <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> NELLE ACQUE: SIGNIFICATO SANITARIO E METODOLOGIA DI ANALISI	10
ENTEROCOCCHI FECALI	15

Il problema dell'identificazione batterica: nuovi strumenti molecolari per descrivere la biodiversità

La necessità di una corretta identificazione batterica è comune in tutti i settori di ricerca che operano in campo ambientale. Si stima, infatti, che ad oggi siano state identificate più di 3.000 specie batteriche e che queste costituiscano solo una minima parte (1-10%) di quelle esistenti. Per identificare dei microrganismi è necessario determinarne essenzialmente una serie di proprietà che consentano di verificarne la similarità con altri già noti e descritti. Ciò è stato effettuato nel corso di decenni sulla base di proprietà morfologiche, fisiologiche e genetiche. Contrariamente a quanto è avvenuto per gli organismi superiori però la classificazione dei batteri secondo tali criteri non ha consentito di descrivere i rapporti di discendenza (o "filogenetici") tra i vari componenti; ciò costituisce invece, da un punto di vista biologico, uno degli obiettivi prioritari di un nuovo sistema di classificazione. Per questo oggi si è ormai diffuso un sistema di classificazione che utilizza, per poter mettere in evidenza le differenze di ogni componente del mondo vivente, l'analisi ed il confronto di sequenze geniche. In particolare, è stato scelto come gene di riferimento quello che codifica l'acido ribonucleico (RNA) contenuto nei ribosomi (RNA ribosomiale, rRNA). Quest'ultimi, infatti, presiedono alla sintesi proteica, una funzione fondamentale per la sopravvivenza ed il funzionamento di tutte le cellule. Gli rRNA (presenti in tre forme, di diversa conformazione e lunghezza: 5S, 16S e 23S) sono eccellenti cronometri filogenetici in quanto contengono al loro interno diverse regioni con sequenze altamente conservate (che non hanno subito alcuna modificazione nel corso dell'evoluzione, e sono quindi identiche in tutti gli organismi) ma anche regioni con una certa variabilità e che quindi possono essere utilizzate per l'identificazione e la discriminazione fra specie diverse. La scelta preferenziale dell'rRNA 16S come molecola elettiva per sviluppare la filogenia dei Procarioti è stata, infine, motivata dalle sue più maneggevoli dimensioni e quindi, in definitiva, da una maggiore semplicità di utilizzo.

Il gene per l'rRNA 16S è stato *sequenziato* in una grande varietà di organismi viventi e tali informazioni sono state utilizzate da Woese (1987) per determinare quella che viene definita *distanza evolutiva* tra due specie misurata in base al numero di differenze nella sequenza nucleotidica. Questo approccio innovativo viene seguito su tutti i nuovi isolati e l'insieme delle sequenze ottenute va ad arricchire le informazioni contenute nelle banche geniche e, di conseguenza, le nostre conoscenze relative alla biodiversità nel mondo vivente.

Il sequenziamento del rDNA 16S consente non solo di identificare e definire con precisione la posizione filogenetica del singolo microrganismo ma anche di definire zone di tale gene specifiche solo per quel

determinato batterio e di costruire pertanto sonde molecolari per la corretta identificazione *in situ* su campioni ambientali senza ricorrere all'isolamento in coltura pura. La metodologia molecolare maggiormente applicata per caratterizzare biomasse miste è rappresentata dall'impiego di sonde molecolari fluorescenti, utilizzate con successo nel corso degli ultimi anni per monitorare *in situ* le dinamiche di popolazioni microbiche in campioni ambientali. È importante sottolineare che per loro natura le sonde molecolari consentono di identificare i singoli componenti di comunità microbiche e di studiarne la presenza nel tempo ma non forniscono alcuna informazione riguardo alle caratteristiche fisiologiche e metaboliche o, in altri termini, all'effettivo ruolo svolto dalle diverse classi di microrganismi presenti. Le sonde molecolari sono costituite da sequenze di oligonucleotidi a catena corta (15-30 nucleotidi), sintetizzate in laboratorio, che possono ibridarsi (legarsi specificamente) con una sequenza complementare di RNA ribosomiale 16S o 23S. Tali sonde, a cui è stato precedentemente legato un composto colorato o fluorescente, messe a contatto con il campione biologico da analizzare, penetrano nelle cellule e, se trovano gli acidi nucleici con sequenza complementare, si legano tramite legami idrogeno. Il preparato, dopo semplice lavaggio per rimuovere le sonde non legate, può essere osservato con microscopia ad epifluorescenza. La caratterizzazione di una biomassa mista tramite sonde molecolari può procedere piramidamente attraverso l'utilizzo iniziale di sonde generali per grandi raggruppamenti (ad esempio Eubacteria e Archea o, all'interno degli Eubacteria, le sottoclassi α , β , γ , δ , ϵ , dei Proteobacteria, oppure High G+C Gram positive, ecc.) per poi passare gradualmente a sonde più specifiche che consentono una identificazione rigorosa fino a livello di specie.

La tecnica FISH di seguito descritta deriva dal lavoro di Amann (1995) ed è applicabile a campioni che non devono essere concentrati mediante filtrazione. In questa sede l'esempio di applicazione è quello relativo ai sistemi di trattamento a fanghi attivi.

Nel caso di campioni ambientali caratterizzati da una bassa concentrazione di biomassa, questi vengono concentrati mediante filtrazione e l'analisi FISH viene effettuata direttamente su filtro. La procedura è molto simile a quella di seguito descritta in termini di reagenti e fasi operative. Un protocollo dettagliato della FISH su filtro viene descritto in Pernthaler *et al.*, 2001.

Tecnica FISH: descrizione della procedura

La tecnica prevede un preventivo fissaggio del campione da effettuare immediatamente, subito dopo il prelievo. Ciò è essenziale per mantenere l'integrità morfologica delle cellule in seguito all'esposizione nel corso dell'ibridazione ad elevate temperature, a detergenti ed a gradienti osmotici. Inoltre il fissaggio

del campione favorisce una maggiore permeabilità delle cellule alle sonde molecolari. Di seguito vengono descritte le modalità di fissaggio e le principali fasi della tecnica. Generalmente il fissaggio in paraformaldeide è più adatto per le cellule Gram negative mentre per i campioni contenenti cellule Gram positive è necessario fissarne una aliquota anche con etanolo.

Fissaggio del campione

Gram positivi: aggiungere 3 volumi di paraformaldeide ad 1 volume di campione e mantenere a 4 °C per 1-3 ore. Centrifugare il campione per eliminare il fissativo (5000 x g). Lavare le cellule con tampone PBS 1X e sospendere il pellet nello stesso tampone in modo da ottenere $10^8 - 10^9$ cellule/mL. Aggiungere 1 volume di etanolo al 98% freddo e mescolare. Le cellule così fissate possono essere mantenute a -20 °C per diversi mesi.

Gram negativi: aggiungere 1 volume di etanolo al 98% freddo a 1 volume di campione e mantenere a 4 °C per 4-16 ore. Centrifugare (5000 x g) per rimuovere il fissativo e lavare le cellule in PBS 1X. Sospendere le cellule in PBS 1X in modo da ottenere $10^8 - 10^9$ cellule/mL. Le cellule così fissate possono essere mantenute a -20 °C per diversi mesi.

Reagenti

Tutte le soluzioni e il materiale utilizzato per la FISH deve essere sterilizzato.

Paraformaldeide: riscaldare 65 mL di acqua distillata a 60 °C ed aggiungere 4 g di paraformaldeide. Aggiungere una goccia di NaOH 2M e mescolare rapidamente fino a quando la soluzione diventa limpida (generalmente ciò avviene dopo 1-2 minuti). Togliere la soluzione dalla fonte di calore ed aggiungere 33 mL di PBS 3X. Correggere il pH a 7,2 con HCl. Eliminare ogni eventuale cristallo residuo mediante filtrazione sterile (filtro 0,2µm). Raffreddare rapidamente la soluzione a 4 °C e mantenerla a questa temperatura.

Tampone PBS: NaCl (130 mM); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (7,2 mM); $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,8 mM).

Etanolo 98% mantenuto a -20°C.

NaCl 5M

Tris/HCl 1M

Acqua distillata sterile

SDS 10%

Ibridazione in situ

Si utilizzano per l'ibridazione *in situ* vetrini speciali rivestiti con materiale idrofobico (teflon) ad eccezione delle zone in cui viene posto il campione. Sono in commercio vetrini rivestiti in teflon con 6, 8 o 12 pozzetti in cui effettuare l'ibridazione. Ciò permette di tenere separati e quindi di analizzare più campioni sullo stesso vetrino. Generalmente, accanto alle normali ibridazioni, vengono posti sullo stesso vetrino

un controllo positivo (per verificare l'efficacia della sonda molecolare utilizzata) ed un controllo negativo (lo stesso campione da analizzare senza aggiunta della sonda per evidenziare eventuali problemi di autofluorescenza a carico di particolari microrganismi presenti nel campione).

3 µL di campione fissato vengono lasciati essiccare all'aria su ogni singolo punto di osservazione di tali vetrini. Le patine essiccate vengono in seguito disidratate immergendo il vetrino in successione per tre minuti in soluzioni di etanolo a concentrazione crescente (50, 80 e 98%). I vetrini così trattati possono essere conservati indefinitamente. Per ogni reazione di ibridazione vengono aggiunti 8 µL di tampone di ibridazione e 0,5 µL di sonda molecolare alla concentrazione di 50 ng/µL. Il vetrino viene quindi incubato a 46 °C per 2 ore orizzontalmente in un tubo di polipropilene in cui è stata posta della carta imbevuta di tampone di ibridazione. Ciò viene fatto per evitare la concentrazione della soluzione di ibridazione per evaporazione ed il conseguente probabile legame non specifico delle sonde alle cellule. Il tampone di ibridazione contiene NaCl 0,9 M, Tris/HCl 20 mM, SDS 0,01%, x % di formamide, pH 7,2. La quantità di formamide aggiunta nel tampone di ibridazione varia a seconda della sonda utilizzata e viene definita e fornita ogni qualvolta sono messe a punto nuove sonde molecolari.

Fase di lavaggio

Questo passaggio si rende necessario per rimuovere completamente le sonde molecolari che non si sono legate. La procedura prevede un lavaggio del vetrino in un tampone i cui componenti sono gli stessi utilizzati per il tampone di ibridazione (NaCl, Tris HCl, SDS) con l'eccezione della formamide. La concentrazione dei vari reagenti è costante (le concentrazioni finali sono le seguenti: Tris HCl 20 mM, SDS 0,01%), mentre varia la concentrazione di NaCl che è dipendente dalla stringenza (dalla concentrazione di formamide) utilizzata nella fase di ibridazione. Ad esempio nel caso si sia utilizzata una percentuale di formamide nel tampone di ibridazione pari al 20 %, la concentrazione finale di NaCl nel tampone di lavaggio deve essere pari a 225 mM.

Il tampone di lavaggio viene preparato in tubi di polietilene da 50 mL e viene preriscaldato in un bagno termostatico a 48 °C. Dopo l'ibridazione il vetrino viene rimosso con cautela dal tubo, sciacquato immediatamente in tampone di lavaggio, preriscaldato a 48 °C, e mantenuto immerso nel tampone per 15 minuti.

Successivamente il vetrino viene lavato con dell'acqua distillata ed immediatamente asciugato mediante getti di aria compressa per rimuovere ogni goccia di acqua dalla superficie del vetrino.

Sonde molecolari

I fluorocromi maggiormente utilizzati sono la FITC (fluorescenza verde; eccitazione: 490, emissione 525), CY3 (fluorescenza arancio; eccitazione 575, emissione 605) e CY5 (fluorescenza infrarosso; eccitazione 640, emissione 705). Gli oligonucleotidi modificati vengono generalmente acquistati alla concentrazione pari a 0,2 μmol e diluiti alla concentrazione di lavoro pari a 50 ng/ μL . Si consiglia di suddividere la soluzione in piccole aliquote da conservare a -20°C .

Osservazione in epifluorescenza

Una volta asciugati, i vetrini sono pronti per essere osservati in epifluorescenza (Filtro Zeiss n. 10 per FITC e n. 15 per la CY3, n. 1 per il DAPI). Sul vetrino vanno poste alcune gocce di Citifluor o Vectashield ed il coprioggetto. E' necessario spandere il Citifluor o il Vectashield formando un film sottile che copra tutte le reazioni di ibridazione effettuate sul vetrino stesso, facendo attenzione che, quando si osservano i vetrini con obiettivi ad immersione, il Citifluor/Vectashield non entri in contatto con l'olio di immersione stesso.

Esempio di applicazione e potenzialita' della tecnica

Un importante settore di applicazione della tecnica FISH e' rappresentato dai sistemi di trattamento delle acque di scarico. Per lungo tempo i microrganismi responsabili di gravi problemi di malfunzionamento degli impianti di depurazione sono stati identificati sulla sola base morfologica. La corretta identificazione batterica non rappresenta un aspetto marginale nella gestione di tali sistemi ma costituisce uno dei passi fondamentali nella definizione di idonee strategie di intervento in caso di problemi di funzionamento causati da batteri filamentosi e/o dalla scarsa presenza di batteri che presiedono importanti processi biologici come i microrganismi nitrificanti, denitrificanti o fosforo - accumulanti. In particolare, per quanto riguarda i batteri filamentosi, l'ostacolo principale che normalmente si riscontra nella normale gestione degli impianti di trattamento, e' rappresentato dalla rapida e corretta identificazione del microrganismo filamentoso che sta determinando il fenomeno biologico. Ciò talvolta non risulta possibile poiché tali microrganismi vengono identificati in base alle sole caratteristiche morfologiche ed alla risposta a particolari colorazioni biologiche (vedi i due principali manuali di riconoscimento: Eikelboom & van Buijsen, 1983 e Jenkins *et al.*, 1993) e ciò può dar luogo ad errori di valutazione e di conseguenza non garantire l'efficacia degli interventi correttivi apportati.

Nel corso della recente 3^a Conferenza Internazionale sui microrganismi nei fanghi attivi e nei processi a biofilm, organizzata da IWA (International Water Association) e CNR-IRSA, sono stati molteplici i

contributi relativi alla messa a punto di sonde molecolari specifiche per l'identificazione di microrganismi in tali sistemi. Fra questi va segnalato quello relativo alla definizione di sonde specifiche per l'identificazione di *Nostocoida limicola*, il batterio filamentoso che rappresenta la causa principale di disfunzioni nei sistemi di trattamento di reflui industriali (Snaidr *et al.*, 2001).

In Tab. 1 sono riportate alcune delle sonde molecolari maggiormente utilizzate per la caratterizzazione di campioni di fango attivo. Facendo riferimento in particolare all'identificazione di batteri filamentosi, l'analisi microscopica procede per gradi: 1) osservazione del campione in contrasto di fase per mettere in evidenza i principali morfotipi presenti e 2) successiva osservazione in epifluorescenza. La tecnica FISH permette di effettuare sullo stesso preparato ibridazioni con sonde molecolari diverse avendo cura di rispettare la stringenza delle singole sonde (la stringenza è legata al potere denaturante della formammide). Le sonde infatti possono essere aggiunte contemporaneamente se la % di formammide richiesta e' la stessa; in caso contrario le ibridazioni vanno eseguite in successione utilizzando le sonde in ordine decrescente di stringenza. E' di rigore l'utilizzo sullo stesso vetrino di un controllo positivo (per verificare l'efficacia della sonda e delle condizioni di ibridazione) e di un controllo negativo (patina dello stesso campione senza aggiunta della sonda specifica). Generalmente, la stima della presenza di una determinata specie batterica rispetto alle cellule totali viene effettuata mediante la contemporanea ibridazione con una sonda generale per gli eubatteri (EUB 338, vedi Tab. 1) o mediante una post-colorazione con un colorante per il DNA quale il DAPI. Infatti, utilizzando sonde marcate con fluorocromi che emettono fluorescenza a differenti lunghezze d'onda, è possibile trattare un campione con più sonde contemporaneamente e quindi identificare e quantificare molteplici forme microbiche. Il campione su cui e' stata effettuata l'analisi FISH puo' essere ulteriormente colorato con post-colorazioni specifiche quali la Gram o la Nilo Blu che viene utilizzata per mettere in evidenza particolari inclusioni cellulari (come i polioidrossialcanoati). In questi casi alla specifica cellula identificata tramite FISH si puo' associare una proprieta' (come ad esempio la capacita' di stoccaggio di particolari polimeri di riserva) o informazioni riguardo la composizione della parete batterica. A titolo di esempio, in tabella 1 si riportano alcune delle sequenze di sonde specifiche per l'identificazione di specie particolari di microrganismi usualmente presenti nei fanghi attivi, unitamente ad informazioni relative al sito di attacco delle sonde sulla molecola di rRNA bersaglio ed alla percentuale della sostanza denaturante (formammide), fondamentale durante la reazione di ibridazione per ottenere un legame ottimale della sonda con l' rRNA.

La tecnica FISH viene generalmente utilizzata in microscopia ad epifluorescenza convenzionale e viene ampiamente impiegata per identificare

Tab. 1 - Principali sonde molecolari attualmente disponibili per alcuni microrganismi importanti nell'ambito dei sistemi di trattamento delle acque di scarico - Sono riportate le sequenze, il sito specifico di attacco delle sonde sull'rRNA e la percentuale di formammide utilizzata nella reazione di ibridazione

Microrganismo	Sonda	Sequenza della sonda (5' - 3')	Bersaglio e posizione *	% formammide	Riferimento
Universale	UNI1392	ACGGGCGGGTGTGTRC	16S, 1392-1406	0	Olsen <i>et al.</i> , 1986
Eubatteri	EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S,338-355	20	Amann <i>et al.</i> , 1990
Archea	ARC915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	16S, 915-934	35	Stahl & Amann, 1991
Proteobatteri					
Sottoclasse α	ALF1b	CGTTCGYTCTGAGCCAG	16S, 19-35	20	Manz <i>et al.</i> , 1992
Sottoclasse β	BET42a	GCCTTCCCACCTTCGTTT	23S, 1027-1043	35	Manz <i>et al.</i> , 1992
Sottoclasse γ	GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027-1043	35	Manz <i>et al.</i> , 1992
<i>M.parvicella</i>	MP222	GCCGCGAGACCCTCCTAG	16S, 223-240	20	Erhart <i>et al.</i> , 1997
<i>Thiothrix nivea</i>	TN1	CTCCTCTCCCACATTCTA	16S, 652-669	45	Wagner <i>et al.</i> , 1994a
<i>H. hydrossis</i>	HHY	GCCTACCTCAACCTGATT	16S, 655-672	20	Wagner <i>et al.</i> , 1994a
Type 021N	21N	TCCCTCTCCCAAATTCTA	16S,652-669	35	Wagner <i>et al.</i> , 1994a
<i>S.natans</i>	SNA	CATCCCCCTCTACCGTAC	16S,656-673	45	Wagner <i>et al.</i> , 1994a
<i>Acinetobacter</i> sp.	ACA	ATCCTCTCCCATACTCTA	16S, 652-669	35	Wagner <i>et al.</i> , 1994b
Batteri nitrificanti:					
<i>Nitrosomonas, Nitrococcus</i>	NEU23a	CCCCTCTGCTGCACTCTA	16S, 338-355	40	Wagner <i>et al.</i> , 1995
<i>Nitrosomonas, Nitrococcus, Nitosolobus, Nitrosovibrio, Nitrosospira e Gallionella</i>	Nso1225	CGCGATTGTATTACGTGTGA	16S, 1225-1244	35	Mobarry <i>et al.</i> , 1996
<i>Nitrobacter</i> spp.	NIT2	CGGGTTAGCGCACCGCCT	16S, 1433-1450	40	Wagner <i>et al.</i> , 1996
<i>Nitrobacter</i> spp.	NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	16S, 1030-1047	40	Wagner <i>et al.</i> , 1996
Batteri denitrificanti:					
<i>Pseudomonas</i> spp	Ps	GCTGGCCTAGCCTTC	23S, 1432-1446	35	Schleifer <i>et al.</i> , 1992
<i>Paracoccus</i> spp.	PAR651	ACCTCTCTCGAACTCCAG	16S, 651-668	40	Neef <i>et al.</i> , 1996
<i>Paracoccus</i> spp.	PAR1244	GGATTAACCCACTGTCACC	16S, 1244-1283	20	Neef <i>et al.</i> , 1996
<i>Paracoccus</i> spp.	PAR1457	CTACCGTGGTCCGCTGCC	16S, 1457-1474	35	Neef <i>et al.</i> , 1996
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Pdv198	CTAATCCTTTGGCGATAAATC	16S, 198-232	20	Neef <i>et al.</i> , 1996
<i>Paracoccus denitrificans</i>	Pdv1031	CCTGTCTCCAGGTCACCG	16S, 1031-1048	35	Neef <i>et al.</i> , 1996

* secondo la numerazione di *E. coli* in Brosius *et al.*, 1978

microorganismi nei piu' diversi campioni ambientali. Tuttavia, nei casi in cui l'analisi viene effettuata su campioni complessi caratterizzati dalla presenza di aggregati microbici l'osservazione tramite microscopia convenzionale risulta complessa.

In questi casi, la tecnica FISH viene utilizzata in combinazione con la microscopia laser confocale (CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy) che consente di analizzare con elevata risoluzione un piano focale di dimensioni definite, scelte dall'operatore, a diverse profondità nel preparato e di «guardare» pertanto all'interno dei campioni biologici creando delle immagini perfettamente tridimensionali. In tal modo si elimina ogni interferenza dai piani focali sottostanti e sovrastanti quello scelto e si ottengono immagini nitide dei piani analizzati con l'enorme vantaggio di contare le singole cellule anche in aggregati compatti (ad esempio, e' adatto nel caso dei fiocchi di fango attivo e nell'analisi di biofilm). Utilizzando sonde con diversa specificita' si puo' definire l'esatta collocazione sterica dei vari componenti microbici della biomassa e ricostruire "l'architettura" dell'aggregato. Va sottolineato come l'introduzione del CLSM abbia drasticamente ridotto i tempi della quantificazione tramite FISH. Per molti anni, infatti la quantificazione e' stata effettuata solamente mediante la conta microscopica delle cellule fluorescenti; cio' significa ore trascorse al microscopio e misure non accurate nel caso di campioni contenenti cellule fortemente aggregate. La conta effettuata tramite CLSM non solo migliora drasticamente la qualita' delle immagini ma permette anche una quantificazione semiautomatica mediante l'analisi di immagini digitali. I protocolli messi a punto recentemente permettono di misurare il biovolume di cellule colorate di una specifica popolazione batterica e di riferirlo al volume dei microrganismi colorati con una sonda batterica o con un colorante che si lega al DNA come il DAPI. Mentre con la tecnica manuale solo poche centinaia o migliaia di cellule possono essere contate, i protocolli semi-automatici permettono di contare facilmente piu' di 100.000 cellule per misura, in modo piu' corretto e riproducibile.

Recentemente sono state messe a punto combinazioni della tecnica FISH con sistemi che permettono la quantificazione rapida di campioni caratterizzati da biomassa dispersa (ad es. citometria di flusso, Wallner *et al.*, 1993) o la contemporanea definizione di alcune proprieta' fisiologiche del microrganismo identificato (ad esempio, la microautoradiografia o tecnica MAR, Andreasen and Nielsen 1998). La combinazione FISH-MAR ha permesso, ad esempio, lo studio *in situ* della capacita' del microrganismo identificato di utilizzare determinati substrati carboniosi o di denitrificare azoto nitrico.

Bibliografia

Amann R.I., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., and Stahl, D.A. (1990):

"Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations", *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1919-1925.

Amann R.I. (1995): "In situ identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes", in: *Molecular Microbial Ecology Manual*, 3.3.6, 1-15.

Andreasen K., Nielsen P.H. (1998): "In situ characterization of substrate uptake by *Microthrix parvicella* using microautoradiography", *Wat. Sci. Techn.* **37**, 19-26.

Brosius J., Palmer M.L., Kennedy P.J., Noller H.F. (1978): "Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*", *Proc.Natl.Acad. Sci. USA*, **75**, 4801-4805.

Eikelboom, D.H. and van Buijsen, H.J.J. (1983): "*Microscopic Sludge Investigation Manual*", 2nd edn., The Netherlands: TNO, Delft, 100 pp.

Erhart R., Bradford D., Seviour R.J., Amann R., Blackall L.L. (1997): "Development and use of fluorescent *in situ* hybridization probes for the detection and identification of "*Microthrix parvicella*" in activated sludge", *System. Appl. Microbiol.*, **20**, 310-318.

Jenkins, D., Richard, M.G. and Daigger, G.T. (1993): "*Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*", New York: Lewis Publishers, 193 pp.

Manz W., Amann R., Ludwig W., Wagner M., Schleifer K.H. (1992): "Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions", *System. Appl. Microbiol.*, **15**, 593-600.

Mobarry B.K., Wagner M., Urbain V., Rittmann B.E., and Stahl D.A. (1996): "Phylogenetic Probes for Analyzing Abundance and Spatial Organization of Nitrifying Bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2156-2162.

Neef A., Zaglauer A., Meier H., Amann R., Lemmer H., and Schleifer K.H. (1996): "Population Analysis in a Denitrifying Sand Filter: Conventional and In Situ Identification of *Paracoccus* spp. in Methanol-Fed Biofilms", *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4329-4339.

Olsen G.J., Lane D.J., Giovannoni S.J., Pace N.R., Stahl D.A. (1986): "Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach", *Ann. Rev. Microbiol.*, **40**, 337-365.

Pernthaler J., Glockner F.O., Schonhuber W., Amann R. (2001): "Fluorescence in situ hybridization (FISH)

with rRNA-targeted oligonucleotide probes", *Methods in Microbiology*, **30**, 207-225.

Schleifer K. H., Amann R., Ludwig W., Rothmund C., Springer N., and S. Dorn (1992): "Nucleic acid probes for the identification and in situ detection of pseudomonads", In E. Galli, S. Silver, and B. Witholt (ed.) *Pseudomonas: molecular biology and biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 127-134.

Snidr J., Beimfohr C., Levantesi C., Rossetti S., van der Waarde J., Geurkink B., Eikelboom D., Lemaître M. Tandoi V. (2001): "Phylogenetic analysis and *in situ* identification of *Nostocoida limicola*-like filamentous bacteria in activated sludge from industrial wastewater treatment plants", in: Proc. 3rd IWA International Specialised Conference on "Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes", Eds. Tandoi, Passino, Blundo, Roma 13-15 giugno, 2001, 61-67

Stahl D.A., Amann R.I. (1991): "Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics", In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Sequencing and hybridization techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Chichester, England., 205-248.

Wagner M., Amann R.I., Kampfer B., Assmus B., Hartmann A., Hutzler P., Springer N., and Schleifer K. H. (1994a): "Identification and *in situ* detection of Gram-negative filamentous bacteria in activated sludge", *Syst. Appl. Microbiol.*, **17**, 405-417.

Wagner M., Erhart R., Manz W., Amann R., Lemmer H., Wedi D., and Schleifer K. H. (1994b): "Development of an rRNA-Targeted Oligonucleotide Probe Specific for the Genus *Acinetobacter* and its Application for In Situ Monitoring in Activated Sludge", *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 792-800.

Wagner M., Rath G., Amann R., Koops H.P., and Schleifer K. H. (1995): "*In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria", *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 251-264.

Wagner M., Rath G., Amann R., Koops H.P., Flood J. and Amann R. (1996): "*In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants", *Wat. Sci. Tech.*, **3**, 237-244.

Wallner, G., Amann R., Beisker W. (1993): "Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms", *Cytometry*, **14**, 136-143.

Woese C.R. (1987): "Bacterial evolution", *Microbiol. Rev.*, 221-271.

LE APPLICAZIONI DELLA "POLYMERASE CHAIN REACTION" (PCR) ALLA RICERCA DI MICROORGANISMI DI INTERESSE MEDICO NEI CAMPIONI AMBIENTALI

a cura di M. M. Lleo', C. Signoretto, B. Bonato e P. Canepari - Dipartimento di Patologia - Sezione Microbiologia, Università degli Studi, Verona

Riassunto

Le tecniche standard per la ricerca dei microorganismi nelle acque, e più in generale nell'ambiente, non sono in grado di rilevare la presenza di microorganismi non coltivabili. Diventa quindi importante affiancare alle tecniche colturali standard i metodi molecolari che riconoscono molecole specifiche come antigeni e sequenze nucleotidiche. Tra questi metodi negli ultimi anni ha avuto grande sviluppo la PCR in grado di rilevare quantità anche molto esigue di acidi nucleici presenti in campioni ambientali con consistenti e complessi backgrounds. Sebbene la PCR sia una tecnica particolarmente sensibile e specifica, essa deve fare i conti con alcuni problemi quali la mancata distinzione tra cellule vitali e non, in quanto amplifica il DNA anche delle cellule morte, e la sua inibizione da parte di sostanze presenti in campioni ambientali in grado di inattivare la DNA polimerasi. Nel presente lavoro sono stati applicati protocolli di PCR sviluppati in laboratorio alla ricerca di *Enterococcus faecalis* e di *Escherichia coli* in campioni di acqua prelevata dal lago di Garda. L'applicazione di questi protocolli (PCR, cPCR) e delle loro successive modifiche (RT-PCR, magnetic capture-PCR) ha permesso di dimostrare l'utilità di questo metodo molecolare nel rilevare la presenza nelle acque di batteri non coltivabili, e perciò non rilevabili con le tecniche colturali standard, e di valutare la loro vitalità.

Summary

Current standard methods for searching microorganisms in waters and environment are not capable of detecting nonculturable bacteria. For this reason, it become mandatory to add to culture-based methods, molecular techniques which use specific bacterial molecules as targets. Among these methods, PCR has developed rapidly in recent years being capable to detect also low quantities of DNA in samples with high backgrounds. Although PCR is a very sensitive and specific method, it presents some problems in its application to the environment such as the possibility of DNA amplification also from dead cells and its inhibition caused by DNA polymerase-inactivating molecules frequently contained in environmental samples. On the basis of the studies conducted by our group in the University of Verona, we have developed specific PCR protocols to detect *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* cells in the waters of Lake Garda. The application of these

protocols (PCR, cPCR) and of their further modifications (RT-PCR, magnetic capture-PCR) to water samples allowed us to demonstrate the utility of this method in the detection in waters of nonculturable bacterial forms, otherwise undetected with standard culture methods, and in the evaluation of their viability.

La PCR è una tecnica che permette di amplificare un frammento bersaglio di DNA in una reazione a catena catalizzata dalla DNA polimerasi utilizzando specifici oligonucleotidi primer. Il rilevamento di un microorganismo mediante l'amplificazione di un singolo tratto del suo genoma comporta l'individuazione di una sequenza nucleotidica specifica del gruppo tassonomico la cui presenza in un campione vuole essere rilevata. La specificità del rilevamento dipende dal grado di omologia e complementarietà tra la sequenza bersaglio e i primer e dalla temperatura di ibridazione (appaiamento dei primer).

Il processo di amplificazione mediante PCR include: i) la denaturazione del DNA per aprire la doppia catena della molecola, ii) l'appaiamento dei primer alla singola catena di DNA nella zona di complementarietà, e iii) l'estensione dei primer ad opera della DNA Taq polimerasi. L'amplificazione della sequenza richiede in genere da 20 a 40 cicli. I prodotti della PCR o ampliconi vengono rilevati mediante elettroforesi in gel di agarosio o mediante ibridazione con una sonda marcata con prodotti fluorescenti, bioluminescenti o radioattivi.

Il metodo della PCR è applicabile a campioni con un elevato background e perciò è particolarmente indicato per la ricerca di microorganismi che si trovano nell'ambiente. La tecnica è stata sovente utilizzata per il rilevamento e l'identificazione di microorganismi nei cibi, acque, sedimenti e altri campioni ambientali (Rompré *et al.*, 2002; Brunk *et al.*, 2002), nonché per il rilevamento e la quantificazione di microorganismi indicatori di contaminazione fecale, quali *Enterococcus faecalis* ed *Escherichia coli*, in acque ambientali (Lleo' *et al.*, 1999 a, Lleo' *et al.*, 1999 b, Lleo' *et al.*, 2000). A tale scopo sono stati individuati due bersagli specifici di DNA. Per quanto riguarda *E. faecalis*, il bersaglio scelto è localizzato in un frammento cromosomico specie-specifico contenente il gene *pbp5* che codifica per una proteina di membrana coinvolta nella biosintesi del peptidoglicano (Lleo' *et al.*, 1999 b, Lleo' *et al.*, 2000). Per il rilevamento di *E. coli*, invece, è stato scelto il gene *uid* specifico per *E. coli* e *Shigella* spp.

La ricerca delle due specie batteriche nelle acque del lago di Garda è stata condotta utilizzando il metodo colturale standard (conteggio UFC/mL) e parallelamente la tecnica della PCR. I risultati ottenuti applicando ambedue le tecniche su campioni di acqua raccolti in periodi di tempo molto diversi indicano che tra il 42% (21 campioni su 50 raccolti

negli anni 1997 e 1998) ed il 53% (7 campioni su un totale di 13 raccolti nel 2001) dei campioni pur risultando negativi all'esame colturale, sono invece positivi per quanto riguarda la presenza di DNA specifico di *E. faecalis* rilevata mediante PCR (Lleo' *et al.*, 1999b). Per quanto riguarda la presenza di DNA di *E. coli*, indicata dalla specifica amplificazione del gene *uid*, il 46% (6 campioni su 13 raccolti nel 2001) risultarono positivi anche se non contenevano cellule evidenziabili con il metodo colturale.

Poiché è frequente che i microorganismi patogeni e indicatori si trovino in esigue quantità nei campioni di acqua, di solito la PCR viene fatta precedere da uno step di concentrazione mediante filtrazione. E' consigliabile utilizzare membrane con porosità pari a 0,22 µm poiché negli ambienti oligotrofi i batteri vanno incontro a diminuzione delle loro dimensioni. Inoltre la visualizzazione dei prodotti amplificati mediante PCR può essere migliorata se viene utilizzata l'ibridazione con sonde radioattive.

La sensibilità della PCR può anche essere aumentata utilizzando una tecnica chiamata **nested PCR** la quale prevede una prima fase di amplificazione come sopra descritta ed una seconda fase che utilizza il prodotto della prima amplificazione come template il quale viene amplificato utilizzando una coppia di primer che riconosce sequenze interne. La nested PCR aumenta l'efficienza di amplificazione in quanto livelli non rilevabili del prodotto della prima fase di amplificazione vengono ancora amplificati nella seconda fase rendendo così rilevabile il bersaglio originale (Rompré *et al.*, 2002). Inoltre questo metodo aumenta anche la specificità della PCR poiché il secondo ciclo di PCR può avvenire solo se il primo ha avuto luogo in modo corretto. Questo protocollo è stato utilizzato per la ricerca nelle acque di *E. coli*, *Salmonella* spp e *Y. enterocolitica*.

Nonostante l'alta sensibilità del metodo, è di più difficile applicazione la PCR per quanto riguarda la quantificazione dei microorganismi (Brunk *et al.*, 2002; Lleo' *et al.*, 1999 b).

Sono state sviluppate due tecniche per la quantificazione del DNA, la **most-probable-number-PCR** e la **PCR competitiva** (cPCR). Fino ad oggi nessuna di queste due tecniche è stata utilizzata per la quantificazione dei coliformi nelle acque (Rompré *et al.*, 2002). Al contrario, la cPCR è stata da noi applicata alla quantificazione di forme non coltivabili di *Enterococcus faecalis* nelle acque del lago di Garda (Lleo' *et al.*, 1999a). A tale scopo, è stato predisposto un "internal standard" costituito dal frammento di DNA riconosciuto dai primer selezionati nel gene *pbp5* ma di dimensioni minori perché è stato eliminato un tratto interno. Nella tecnica della PCR quantitativa si stabilisce una competizione tra i due frammenti di DNA, il DNA target selvaggi ed il "internal standard", per i primer specifici permettendo così la quantificazione del DNA ritrovato nel campione in esame. Il protocollo messo a punto ha dimostrato una sensibilità che permette di rilevare la presenza di sole 2 cellule/mL. Tutti i campioni di

acqua prelevati dal lago di Garda e risultati negativi all'esame colturale ma positivi per la PCR sono stati sottoposti a cPCR. E' stato possibile calcolare che la quantità di DNA di *E. faecalis* ritrovato varia tra 0,1 e 9 ng che corrispondono a 24-2000 cellule/mL nei diversi campioni di acqua dolce (Lleo'et al., 1999 a, Lleo'et al., 1999 b).

Un altro approccio promettente per quantificare il DNA nei campioni con basse concentrazioni di microorganismi è la **real-time PCR** quantitativa che consiste nel monitorare e quantificare i prodotti fluorescenti risultanti dalla PCR man mano che essi vengono amplificati. Questa quantificazione "real-time" è più reale della quantificazione "end-point" sopra descritta in quanto le misurazioni vengono effettuate già durante la fase esponenziale. Questa tecnica è stata di recente applicata alla ricerca di *E.coli* enteroemorragico ed enterotossigeno in microbiologia clinica (Rompré et al., 2002). Tuttavia, vanno messi in evidenza gli alti costi per l'acquisizione delle strumentazioni assai sofisticate.

Più recentemente è stata proposta una enumerazione diretta delle cellule bersaglio utilizzando un saggio diretto di **PCR in situ**. L'amplificazione della sequenza specifica viene condotta a partire da un gene a singola copia presente nella cellula. Il protocollo classico della PCR deve essere modificato per poter amplificare la sequenza nucleotidica in vivo. A tale scopo la cellula deve essere fissata e permeabilizzata in modo che i primer e gli altri componenti della reazione possano penetrare nella cellula. I prodotti dell'amplificazione vengono marcati con UTP-digossigenina e successivamente rilevati con anticorpi anti-digossigenina coniugati con sostanze fluorescenti. La tecnica è stata applicata al conteggio di cellule di *E. coli* nelle acque dolci. Il segnale fluorescente ottenuto risulta in genere molto debole e al momento la tecnica non è applicabile al rilevamento di routine dei microorganismi nelle acque (Rompré et al., 2002).

Una ulteriore e importante limitazione inerente le indagini mediante PCR dei campioni ambientali è l'inibizione della reazione enzimatica da parte di svariate sostanze spesso presenti in tali campioni. Questo problema riveste particolare importanza quando i campioni da esaminare contengono basse concentrazioni di microorganismi, situazione molto comune nei campioni ambientali. Allo scopo di ovviare a questa limitazione del metodo della PCR, è stato preparato un protocollo che contempla come primo passaggio la cattura specifica dell'acido nucleico bersaglio e successivamente la sua amplificazione mediante il metodo classico di PCR (**Magnetic capture-PCR**). Vengono utilizzate biglie magnetizzate ricoperte da un primer complementare alla sequenza bersaglio del DNA sfruttando il legame ad alta affinità che si stabilisce tra le molecole di streptoavidina presenti sulla superficie delle biglie e le molecole di biotina previamente legate al primer specifico. L'incubazione delle biglie con il campione contenente le cellule batteriche lisate permette la

cattura dell'acido nucleico da ricercare sottraendolo al background del campione ambientale. A questo punto la PCR può essere portata a termine direttamente sulle biglie previa aggiunta del secondo primer e degli altri componenti necessari alla reazione di amplificazione.

Il metodo è stato validato dal gruppo dell'Università di Verona in campioni di acqua di lago contenenti sostanze inibenti la polimerasi (acidi umici, sostanze vegetali) ed addizionati artificialmente di cellule di *E. faecalis*. Lo specifico rilevamento del DNA è stato ottenuto con un ottimo livello di specificità e sensibilità (fino 10 cellule *E. faecalis*). Il protocollo prevede la lisi delle cellule batteriche presenti nel campione, seguita dall'incubazione del lisato cellulare con le biglie ricoperte del primer specifico e della sua successiva amplificazione. Il metodo risulta quindi di rapida e facile esecuzione permettendo la visualizzazione delle eventuali bande di amplificazione in giornata. La tecnica deve, tuttavia, essere ancora validata su campioni ambientali.

E' importante segnalare che il rilevamento dei prodotti dell'amplificazione indica solo che il DNA bersaglio è presente nel campione ma ciò non implica che il corrispondente microorganismo sia vitale. Infatti, è stato dimostrato che la PCR amplifica anche il DNA delle cellule morte. Il superamento di questa ulteriore limitazione della tecnica classica della PCR è stato ottenuto utilizzando come bersaglio una molecola, quale l'rRNA, con una emivita molto breve, che viene considerata perciò un marcatore di vitalità cellulare (Lleo' et al., 2000). Il rilevamento della presenza di questa molecola con la tecnica della **RT-PCR** avviene attraverso la retro-trascrizione del mRNA e la successiva amplificazione del cDNA sintetizzato. Sono oggi disponibili enzimi con doppia attività di retro-trascrittasi e DNA Taq polimerasi così che le due reazioni avvengano in un'unica miscela di reazione. Anche la RT-PCR può essere applicata alla ricerca di microorganismi nell'ambiente dopo la cattura selettiva dello specifico RNA utilizzando le biglie magnetiche ricoperte di un adeguato primer complementare alla catena di RNA. Anche questo metodo è stato applicato col fine non solo di rilevare la presenza di *E. faecalis* in campioni di acqua ma anche di dimostrare la vitalità delle cellule ritrovate (Lleo' et al., 2000). Questo tipo di saggio riveste particolare importanza per valutare lo stato fisiologico delle cellule batteriche che si ritrovano in condizioni ambientali avverse. In simili condizioni, i batteri, compresi quelli di interesse medico, attivano strategie di sopravvivenza quali lo stato vitale ma non coltivabile (VBNC) (Lleo' et al., 1999 a; Lleo' et al., 1999 b; Lleo' et al., 2000). I batteri VBNC sono vitali ma non più coltivabili in normali terreni di coltura e quindi sfuggono al rilevamento quando vengono applicati i soli metodi colturali. La contemporanea applicazione del metodo a cattura del mRNA con biglie magnetiche permette di superare l'eventuale inibizione della reazione di polimerizzazione da parte

di quelle sostanze sopra ricordate spesso presenti in campioni ambientali.

Bibliografia

Brunk CF, J. Li, E. Avaniss-Aghajani (2002): "Analysis of specific bacteria from environmental samples using a quantitative polymerase chain reaction", *Curr. Issues Mol. Biol.*, **4**, 13-8.

Lleo' M.M., C. Signoretto, MC. Tafi, S. Pierobon, P. Canepari (1999a): "Biologia e metodi di rilevamento delle forme vitali ma non coltivabili di enterococchi", *L'Igiene Moderna*, **112**, 239-253.

Lleo' M.M., MC. Tafi, C. Signoretto, C. Dal Cero, P. Canepari (1999b): "Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water", *FEMS Microbiol. Ecol.*, **30**, 345-353.

Lleo' M.M., S. Pierobon, MC. Tafi, C. Signoretto, P. Canepari: (2000): "mRNA detection by RT-PCR for monitoring viability over time in an *Enterococcus faecalis* viable but nonculturable population maintained in a laboratory microcosm", *App. Environ. Microbiol.*, **66**, 4564-4567.

Rompré A., P. Servais, J. Baudart, M. de Roubin, P. Laurent (2002): "Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches", *J. Microbiol. Methods*, **49**, 31-54.

CISTI DI GIARDIA E OOCISTI DI CRYPTOSPORIDIUM NELLE ACQUE: SIGNIFICATO SANITARIO E METODOLOGIA DI ANALISI

a cura di R. Briancesco e L. Bonadonna - Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto

Cryptosporidium e *Giardia* sono protozoi parassiti responsabili di gastroenteriti nell'uomo; le forme più gravi della malattia si manifestano negli individui immunocompromessi e nei bambini. L'acqua può rappresentare un importante veicolo di trasmissione dell'infezione. Nelle acque la ricerca delle loro forme di resistenza e diffusione, oocisti e cisti rispettivamente, non viene effettuata di routine, anche per le difficoltà insite nelle procedure analitiche necessarie per la loro identificazione. Negli anni più recenti sono stati proposti metodi sempre più efficaci per il loro rilevamento. Di seguito viene presentato un metodo, specifico per l'analisi delle acque, che, attraverso fasi di filtrazione e di concentrazione, consente la determinazione quantitativa, a livello di genere, delle oocisti di *Cryptosporidium* e delle cisti di *Giardia*. Il loro rilevamento può costituire un segnale

della potenziale presenza di specie patogene nell'ambiente idrico.

Summary

Cryptosporidium and *Giardia* have been recognized as etiological agents of gastrointestinal illness in humans with severe consequences on children and immunocompromised individuals. Water can be an important vehicle of infection; in these last years many efforts have been done for looking for effective methods to enumerate oocysts of *Cryptosporidium* and cysts of *Giardia* in water.

The analytical procedure proposed, throughout filtration and concentration steps, allows to enumerate oocysts and cysts belonging to the two genera of protozoa, providing informations on the presumptive presence of pathogenic species in water.

Introduzione

I protozoi *Cryptosporidium parvum* e *Giardia lamblia* sono agenti eziologici di forme acute di gastroenterite nell'uomo, trasmissibili attraverso oocisti e cisti, rispettivamente. In particolare, *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. *Cryptosporidium parvum*, riconosciuto come patogeno per l'uomo dal 1976, è un protozoo coccide, con ciclo biologico complesso e anch'esso monoxeno, e comprendente una fase riproduttiva asessuata e una sessuata che, attraverso una serie di stadi, conducono alla formazione di oocisti. Giardiasi e criptosporidiosi sono patologie a trasmissione fecale-orale, che possono trascorrere in forma asintomatica o determinare una gastroenterite autorisolvibile nei soggetti immunocompetenti. Nei bambini e negli immunodepressi la patologia può manifestarsi in forma più grave, in modo particolare nei malati di AIDS l'infezione da *Cryptosporidium* può cronicizzare, provocando una diarrea persistente, con conseguenze gravi, che possono portare sino alla morte.

Le modalità d'infezione, per entrambi i parassiti, sono rappresentate dal consumo di acqua o di alimenti contaminati, dal contatto interpersonale e con animali che fungono da serbatoi. I dati più recenti hanno dimostrato che le oocisti e le cisti possono essere ritrovate in acque superficiali e profonde, marine e reflue, ma anche in acque non contaminate quali quelle potabili. L'acqua è stata pertanto riconosciuta come uno dei principali veicoli di infezione. La scarsa specificità d'ospite favorisce la diffusione dei parassiti nell'ambiente e l'elevato numero di cisti ed oocisti emesse dagli animali infetti e la loro scarsa suscettibilità alla disinfezione e agli stress ambientali facilitano il loro mantenimento nell'ambiente. E' noto, infatti, che i trattamenti chimico-fisici attuati nei

processi di potabilizzazione e, più in generale, i processi di depurazione delle acque non permettono di garantire l'eliminazione delle cisti e delle oocisti che possono, quindi, ancora essere riscontrate negli effluenti (Bukhari *et al.*, 1997).

Dati contrastanti sono stati registrati relativamente ad eventuali associazioni tra concentrazioni delle forme infettanti e quelle di parametri indicatori di qualità delle acque. Tuttavia, per le acque reflue, alcuni autori hanno calcolato correlazioni significative tra *Cryptosporidium* e pH, potenziale redox, carbonio organico totale da un lato (Bonadonna *et al.*, 2002) e tra *Cryptosporidium* e *Clostridium perfringens* dall'altro (Chauret *et al.*, 1999). E' comunque riconosciuta l'inadeguatezza dei parametri microbiologici tradizionali (coliformi e streptococchi) come indicatori della presenza e del livello quantitativo dei due parassiti nelle acque.

Le acque superficiali possono essere contaminate sia direttamente con feci di animali infetti, sia attraverso acque di dilavamento di suoli adibiti al pascolo di animali infetti, acque di scarico e percolati.

I valori di concentrazione dei due parassiti riscontrati nei diversi tipi di acqua sono molto variabili e risultati diversi possono essere ottenuti anche in funzione dei metodi di rilevamento e di identificazione utilizzati. In acque superficiali il valore di concentrazione delle oocisti e delle cisti può oscillare tra 0 e 10²/L. Indagini effettuate in acque superficiali del territorio italiano hanno messo in evidenza che concentrazioni più elevate si riscontrano per *Giardia* rispetto a *Cryptosporidium*.

Infezioni sono ampiamente segnalate con una prevalenza nei paesi in via di sviluppo. Numerosi casi ed epidemie sono stati registrati negli anni passati in U.S.A., Gran Bretagna e Canada. Tuttavia, attualmente, negli Stati Uniti non sono segnalate epidemie da circa due anni; ciò è legato all'attività di sorveglianza e alle pratiche potenziate di trattamento delle acque. Infatti, per quanto riguarda le epidemie correlate al consumo di acqua potabile la maggior parte di esse sono state messe in relazione a carenze imputabili ai trattamenti di potabilizzazione, alla contaminazione dell'acqua a livello di stoccaggio e di distribuzione, al consumo di acqua superficiale e profonda contaminata e non trattata o solo clorata (World Health Organization, 1996).

In Italia, la ricerca dei due parassiti nelle acque non viene effettuata di routine e, sebbene non esista un'attività di sorveglianza delle malattie idrodifuse, non sembra comunque siano stati segnalati casi di giardiasi e criptosporidioisi trasmessi attraverso l'acqua potabile.

Tuttora esistono difficoltà per il rilevamento e l'enumerazione delle cisti e delle oocisti dalle acque, soprattutto se si tiene in considerazione che i metodi più comunemente in uso non permettono di determinare la vitalità delle forme infettive e la specie di appartenenza. Variazioni notevoli nelle conte sono state riscontrate con diversi protocolli analitici che possono comportare perdite di materiale durante le

varie fasi del processo di concentrazione e di recupero. L'applicazione di procedure di analisi che permettano di ottenere risultati più attendibili e accurati costituisce invece fattore fondamentale per controllare la presenza dei due parassiti nell'ambiente e per verificare, nei loro confronti, l'efficienza dei sistemi di depurazione e di disinfezione delle acque (Ottaviani e Bonadonna, 2000).

Di seguito viene descritta una metodologia analitica proposta dell'Environmental Protection Agency per il rilevamento delle forme infettive dei due parassiti; il metodo può fornire maggiori garanzie di specificità rispetto a precedenti tecniche proposte (Bukhari *et al.*, 1998; EPA, 1999).

CISTI DI GIARDIA E OOCISTI DI CRYPTOSPORIDIUM: PROCEDURA ANALITICA

Obiettivo

Il metodo consente di valutare la concentrazione di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia* in un volume noto di un campione di acqua.

Principio del metodo

La procedura analitica si basa sulla determinazione quantitativa delle forme infettive dei due parassiti. Prevede una filtrazione di acqua attraverso una capsula con porosità nominale di 1 µm, un'eluizione con una soluzione di lavaggio utilizzando uno shaker, una concentrazione e una purificazione dell'eluato tramite centrifugazione e immunoseparazione, ed infine la determinazione e il conteggio al microscopio di cisti ed oocisti mediante immunofluorescenza diretta.

Campo di applicazione

La procedura analitica può essere utilizzata per l'analisi di acque superficiali, di fiume, di lago e di reflui anche sottoposti a trattamento.

Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume da analizzare in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Indicativamente, per acque superficiali potrebbero essere analizzate alcune centinaia di litri di acqua, mentre per acque reflue grezze può essere sufficiente analizzare alcune decine di litri. Per l'esame di reflui trattati può essere necessario analizzare un minimo di 100 L.

Strumentazione e vetreria

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

- agitatore con braccetti;
- agitatore ruotante Sample Mixer MX-1 (DynaL, Oxoid);
- centrifuga refrigerata (+ 4 °C) a rotore basculante per contenitori da 15-50-250 mL;
- contaltri;
- contenitori da centrifuga "disposable" da 50 e 15 mL con fondo conico;
- dispositivo magnetico MPC-1 per provetta L10 con parete piatta (DynaL, Oxoid);
- dispositivo magnetico MPC-S per Eppendorf da 1,5 mL (DynaL, Oxoid);
- filtro a capsula in polietersulfone, (1 µm di porosità, 6 cm di diametro, 12 cm di lunghezza, 1300 cm² di superficie);
- microscopio ad epifluorescenza con filtri di eccitazione 450-490 nm, specchio dicroico separatore del fascio di luce 510 nm, barriera o filtro di soppressione: 515-520 nm, obiettivi 20, 40 e 100x ed oculare con micrometro lineare. E' necessario disporre del contrasto di fase o, meglio, del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- pompa aspirante con portata intorno ai 14 L/min.
- provette L10 con parete piatta;
- regolatore di flusso (DynaL, Oxoid);
- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette;
- vetrini a pozzetto (forniti nei kit per l'immunofluorescenza);
- vetrini a pozzetto Spot-on (DynaL, Oxoid).

Reagenti

Soluzione di PBS (Phosphatase Buffer Saline) 10x

Composizione:

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

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Aggiustare il pH a 7,2±0,2 con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N. Sterilizzare in autoclave per 15 min a 121°C. La soluzione è anche disponibile in commercio pronta per l'uso.

Soluzione di PBS 1x

Composizione:

PBS 10x	100 mL
Acqua distillata	900 mL

Mescolare i due componenti.

Soluzione Idrossido di sodio (NaOH) 0,1 N

Composizione:

NaOH	0,4 g
------	-------

Acqua distillata	100 mL
------------------	--------

Sciogliere su agitatore magnetico.

Soluzione di Acido cloridrico (HCl) 0,1 N

Composizione:

HCl 37%	0,82 mL
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere in acqua distillata.

Tampone per eluizione

Composizione:

Laureth 12	1 g
Tris 1M, pH 7,4	10 mL
EDTA, 2Na 0,5 M, pH 8	2 mL
Antischiuma A	150 µL
Acqua distillata	

Pesare il Laureth-12 in un contenitore di vetro pirex e aggiungere 100 mL di acqua distillata. Scaldare su una piastra o in un forno a microonde per consentire al Laureth-12 di sciogliersi. Trasferire la soluzione in un matraccio da 1 L.

Sciacquare il contenitore di vetro numerose volte e mettere l'acqua di risciacquo nel matraccio. Aggiungere gli altri reattivi. Portare ad 1 L con acqua distillata.

Tris 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 1 L con acqua distillata.

Sterilizzare con un filtro a membrana da 0,22 µm; conservare in un contenitore di plastica a temperatura ambiente.

EDTA, 2Na 0,5 M, pH 8

Composizione:

EDTA 2 Na 2 H ₂ O	186,1 g
Acqua distillata	

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

Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta.

Componenti:

- ✓ Anticorpi monoclonali diretti contro le oocisti di *Cryptosporidium* e le cisti di *Giardia* coniugati con Iotiocianato di Fluoresceina (FITC).
- ✓ Controllo positivo;

- ✓ Controllo negativo;
- ✓ Tampone di lavaggio;
- ✓ Soluzione di montaggio (Mounting Medium).

Procedura

Campionamento e volume da analizzare

Questo metodo consente di campionare volumi variabili d'acqua (10-700 L) in relazione alla sua torbidità, usando eventualmente più cartucce per filtrare il volume appropriato. Il campionamento può essere effettuato secondo lo schema riportato in Ottaviani e Bonadonna (2000), ponendo la pompa e gli altri accessori a valle della capsula, oppure ponendo la pompa a monte o utilizzando un sistema in pressione (rubinetto). Il flusso deve essere intorno a 2 L/min e la pressione misurata sul manometro non deve mai superare 2 bar. 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 avere 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 di acqua 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 si riduce in conseguenza dell'intasamento della capsula. Trasportare la capsula in condizioni refrigerate in laboratorio e procedere all'analisi entro 24 ore dal prelievo.

Eluizione della capsula

Per ogni capsula sono necessari 240 mL di tampone per eluizione.

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.

Aggiungere 120 mL di tampone per eluizione 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 rpm. Versare l'eluato in un tubo da centrifuga.

Aggiungere gli altri 120 mL di tampone per eluizione 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 rpm.

Miscelare l'eluato con il precedente ed aggiungere l'eventuale residuo d'acqua tenuto da parte.

Centrifugare a 1100 x G per 15 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 un'analisi diretta al microscopio a fluorescenza, è necessario procedere alla chiarificazione del campione.

Chiarificazione mediante immunoseparazione

L'efficienza di recupero della metodica varia dal 60 al 95% se, relativamente al particolato presente nell'acqua, sono rispettati i limiti indicati. E' inoltre opportuno includere tra i campioni da sottoporre a purificazione alcuni controlli positivi a concentrazione nota di cisti e oocisti, che, processati contemporaneamente, consentono una più precisa valutazione di efficienza di recupero del metodo.

La metodica prevede che le cisti e le oocisti di *Giardia* e *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*. 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.

La quantità di materiale particolato in ciascun campione concentrato di 10 mL deve essere inferiore a 0,5 mL, altrimenti il campione deve essere diluito e diviso in più aliquote prima di procedere alla chiarificazione.

Preparazione del campione

10 mL di campione, risospeso in PBS 1X, sono trasferiti in un'apposita provetta con parete piatta e addizionati di 1 mL di tampone A 10 X, 1 mL di tampone B 10 X, 100 µL della sospensione di microsfere anti-*Cryptosporidium* e 100 µL della sospensione di microsfere anti-*Giardia*. Le sospensioni di microsfere devono essere agitate vigorosamente mediante vortex immediatamente prima di essere usate. Il campione è quindi incubato in agitazione-rotazione nell'apposito mixer per un'ora a temperatura ambiente. La provetta è poi inserita nel dispositivo MPC-1 con la parete piatta rivolta verso il magnete ed il dispositivo ruotato 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 ed oocisti

aderiscono alla parete della provetta esposta al magnete. Senza rimuovere la provetta dal dispositivo, il supernatante è eliminato capovolgendo il dispositivo stesso. La provetta viene quindi tolta dal dispositivo magnetico e il campione risospeso in 1 mL di tampone A 1X. La soluzione è quindi trasferita in una provetta Eppendorf da 1,5 mL e questa inserita nell'apposito dispositivo MPC-S con la parete magnetica inserita. Il campione è quindi agitato manualmente ruotando il dispositivo in modo da compiere un movimento di 90° al secondo per la durata di un minuto. Il supernatante è immediatamente aspirato, facendo attenzione a non rimuovere anche i complessi microsferi cisti/oocisti. La barra magnetica è rimossa e il campione è quindi risospeso in 50 µL di HCl 0,1 N, agitato per 5 secondi mediante vortex e lasciato a temperatura ambiente per 10 minuti. Dopo ulteriore agitazione mediante vortex per 5 secondi il campione è trasferito 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.

Determinazione mediante immunofluorescenza diretta

Si usano anticorpi monoclonali di topo anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* coniugati con FITC, che si legano ad antigeni presenti sulle pareti di cisti e oocisti. I kit presenti in commercio forniscono oltre agli anticorpi, controlli positivi e negativi, tampone di lavaggio e soluzione di montaggio. E' opportuno, parallelamente all'analisi dei campioni, preparare sempre vetrini con controlli positivi e negativi.

La procedura descritta è quella da effettuarsi su vetrino a pozzetto. Se è stata applicata la tecnica della chiarificazione per immunoseparazione, è opportuno usare i vetrini Dynal Spot-on.

Portare i reattivi del kit a temperatura ambiente. Trasferire 10-50 µL di campione in un pozzetto, distribuire con una bacchetta di plastica su tutta la superficie disponibile.

Trasferire 10 µL del controllo positivo in un pozzetto e 10 µL del controllo negativo in un altro; distribuire con una bacchetta di plastica su tutta la superficie disponibile.

Asciugare a temperatura ambiente o più rapidamente in stufa a circa 37°C. Fissare ciascun campione secondo le modalità indicate dalla ditta produttrice del kit. Mettere 20-50 µL di anticorpo su ciascun pozzetto ed incubare il vetrino in camera umida, al buio, a circa 37°C per 30 minuti. Aspirare l'eccesso di anticorpo usando una pipetta con punta molto fine. Lavare il vetrino con molta cautela usando il tampone di lavaggio fornito dal kit o PBS 1x. Asciugare i vetrini all'aria. Montare il vetrino coprioggetto con una goccia di soluzione di montaggio, facendo attenzione a non formare bolle.

Esame microscopico

Osservare tutto il vetrino a 200 o 400 ingrandimenti con il microscopio ad epifluorescenza selezionando i filtri di eccitazione per l'FITC ed individuare le strutture fluorescenti verde mela con forma e dimensioni caratteristiche delle cisti di *Giardia* (lunghezza 8-12 µm e larghezza 7-10 µm) e oocisti di *Cryptosporidium* (3,5 - 6,5 µm), utilizzando un micrometro lineare ed effettuando confronti con un controllo positivo. Segnare le coordinate del vetrino dove sono state rinvenute cisti e oocisti. Questa valutazione consente di fornire una determinazione presuntiva delle cisti ed oocisti.

Effettuare l'osservazione delle stesse strutture in epifluorescenza a 1000 ingrandimenti in immersione, 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 ed oocisti piene da quelle vuote e, quindi, dare un'ulteriore indicazione sulla presunta vitalità delle forme rilevate. Con il microscopio a contrasto interferenziale è invece possibile valutare la presenza di strutture interne (nuclei, corpi mediani, spazio peritrofico nella *Giardia*; sporozoit e granuli residui nel *Cryptosporidium*), valutazioni che consentono sia di confermare la determinazione, sia di dare una ulteriore indicazione in merito alla condizione delle cisti ed oocisti. Si possono distinguere, infatti, cisti ed oocisti vuote, contenenti strutture amorfe oppure contenenti strutture caratteristiche ben conservate. Effettuata questa valutazione, registrare il conteggio totale di cisti di *Giardia* e di oocisti di *Cryptosporidium*.

Se è stata effettuata anche la valutazione con il contrasto di fase annotare il numero di cisti ed oocisti che risultano piene o vuote.

Se è stata effettuata anche la valutazione con il DIC annotare il numero di cisti ed oocisti vuote, con contenuto amorfo o con strutture interne.

Interpretazione dei risultati

Ogni campione che presenta una o più strutture tipiche assimilabili a cisti di *Giardia* o oocisti di *Cryptosporidium* per fluorescenza, forma e dimensioni può essere considerato presuntivamente un campione positivo.

La torbidità, il particolato organico ed inorganico del campione d'acqua possono interferire con il recupero delle cisti e delle oocisti nella fase di concentrazione e purificazione e con la determinazione delle strutture al microscopio.

Organismi (alghe e lieviti, pollini) 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 interferenze nella individuazione delle strutture interne alle cisti ed oocisti perché possono

causarne la parziale distruzione o trasformazione in strutture amorfe e pertanto irriconoscibili.

Espressione dei risultati

Il numero di cisti ed oocisti contate si riferisce al volume analizzato sul vetrino stesso, ovvero al volume di eluato sottoposto a chiarificazione; tale numero viene rapportato ad 1 mL e moltiplicato per il volume totale dell'eluato (1-50 mL). Il risultato deve essere rapportato al numero di litri di campione filtrati.

Bibliografia

Bonadonna L., R. Briancesco, M. Ottaviani, E. Veschetti (2002): "Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts in sewage effluents and correlation with microbial, chemical and physical water variables", *Environ. Monit. Assess.*, **75**, 241-252.

Bukhari Z., McCuin R.M., Fricker C.R. and Clancy J.L. (1998): "Immunomagnetic separation of *Cryptosporidium parvum* from source water samples of various turbidities", *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4495-4499.

Bukhari Z., Smith H.V., Sykes N., Humphreys S.W., Paton C.A., Girdwood R.W.A. and Fricker C.R. (1997): "Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts and *Giardia* spp. cysts in sewage influents and effluents from treatment plants in England", *Wat. Sci. Techn.*, **35**, 385-390.

Chauret C., Springthorpe S., and Sattar S. (1999): "Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion". *Can. J. Microbiol.*, **45**, 257-262.

EPA Method 1623 (1999): "*Cryptosporidium* and *Giardia* by filtration/IMS/FA". EPA-821-R-99-006.

Ottaviani M. e L. Bonadonna (2000): "*Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano*". Rapporti ISTISAN 00/14, Vol 2 (Pt. 2). Istituto Superiore di Sanità, Roma, 420 pp.

World Health Organization (1996). "*Guidelines for drinking-water quality. Protozoa*". World Health Organization, Geneva, 52-67.

ENTEROCOCCHI FECALI

a cura di M. G. Scialoja*, D. Lev*, A. Sbalchiero**

*Arpa Emilia Romagna

**Anpa, Roma

Riassunto

Malgrado in questi ultimi anni si sia assistito ad una "revisione" del concetto di indicatore fecale microbiologico in ambito idrico, alcuni parametri continuano comunque a rimanere di riferimento nella valutazione dello stato di contaminazione di una risorsa. Gli Enterococchi in particolare sono a tutt'oggi riconosciuti validi per segnalare la potenziale contaminazione fecale, soprattutto in riferimento alle acque di balneazione. Il presente lavoro vuole essere una occasione di incontro tra "addetti ai lavori" finalizzata a proporre nuove metodologie analitiche che consentano di velocizzare le attuali tempistiche pur mantenendosi nell'ambito di tecniche tradizionali e quindi facilmente applicabili anche a livello periferico.

Summary

Although during the last years the meaning of traditional fecal indicator "organism" has been discussed, some parameters, like *Enterococci*, have been yet recognized as valuable indicators of potential fecal contamination, especially for bathing waters.

This paper describes some analytical procedures more rapid, specific, and sensitive than the traditional ones for the determination of *Enterococci* in aqueous environmental samples.

Generalita'

Gli Enterococchi si differenziano dagli altri Streptococchi per la loro capacità di crescere ad elevati pH (9,6), alte temperature (45°C) ed in elevate concentrazioni di sale (6,5 % sodio cloruro); bile resistenti (fino a 40% di sali biliari) ed anaerobi facoltativi, catalasi negativi (preferiscono condizioni microaerofile) complessivamente mostrano caratteristiche di adattamento alla "nicchia ambientale" intestinale. Vivono infatti, come commensali, prevalentemente nell'intestino di animali a sangue caldo.

Da un punto di vista colturale presentano richieste nutrizionali complesse e variabili. Alcuni ceppi richiedono vitamina B ed aminoacidi per sviluppare (AA.VV., 2000; Crossan, 2000; Ely *et al.*, 2000).

Patogenicita'

Sono generalmente resistenti alla maggior parte degli antibiotici utilizzati per i Gram positivi: presentano resistenze intrinseche a cefalosporine, aminoglicosidi, lincosamidi, trimetoprim/sulfametossazolo e resistenze

acquisite ad alcune penicilline, macrolidi, cloramfenicolo, fluorochinoloni, glicopeptidi e tetracicline.

Trasmettono rapidamente le resistenze mediante meccanismi coniugativi ed R-plasmidi.

Non possiedono specifici fattori di virulenza ma producono: sostanze fibrinolitiche, proteine e carboidrati che regolano l'aderenza, batteriocine che inibiscono batteri competitori.

Alcuni ceppi producono elevati livelli di tiramina (che può provocare emicrania) ed istamina; essi producono proteinasi e peptidasi extracellulari che idrolizzano peptidi di grandi dimensioni consentendo loro di trasportarli all'interno del soma batterico e convertirli in aminoacidi (AA.VV., 2000; Crossan, 2000; Ely *et al.*, 2000; Rollins, 2000).

Gli Enterococchi possono determinare patologie connesse al consumo di alimenti contaminati con sintomatologie simili a quelle determinate da *B. cereus* e *C. perfringens*, comprendenti nausea, vomito e diarrea, ma più lievi di quelle determinate da altre tossinfezioni alimentari. Gli Enterococchi raggiungono gli alimenti durante lo sviluppo dei vegetali, i processi di lavorazione o contaminazioni fecali (Crossan, 2000; Rollins, 2000). Essi si comportano da patogeni opportunisti provocando: endocarditi, infezioni del Tratto Genito-Urinario, batteriemie, infezioni di ferite ed ascessi intra addominali (associati ad altri batteri), meningiti; *S. bovis* isolati da emocolture sono fortemente associati con il carcinoma del colon.

Importanti patogeni opportunisti in ambienti nosocomiali sono gli Enterococchi Vancomicina Resistenti (VRE), che hanno rappresentato per gli USA uno dei più importanti patogeni nosocomiali degli anni Novanta. Le più comuni specie implicate sono *E. faecalis* e *E. faecium*; la trasmissione avviene per contatto interpersonale ma la contaminazione ambientale può giocare un ruolo determinante. Gruppi a rischio sono pazienti immunodepressi, prematuri, persone frequentemente esposte a vancomicina (ex. Dializzati). I VRE possono provocare infezioni in svariati distretti, le più frequenti sono al tratto urinario, nelle ferite chirurgiche o batteriemie(BSI). Un grande numero di pazienti colonizzati da VRE funge da riserva non individuabile e da fonte di infezione. In alcuni casi le complicanze delle infezioni non sono trattabili e la mortalità oscilla tra 30-40%. Il National Nosocomial Infection Surveillance System segnala trend in aumento per le infezioni nosocomiali da VRE (AA.VV., 2001, Crossan, 2000).

Nel nostro Paese non sembrano ancora rappresentare un pericolo in quanto la loro percentuale in ambiente clinico non supera comunque il 2%. La loro frequenza in campo alimentare è più interessante: 25% in isolati da formaggi, 37,5% in campioni di carne.

Secondo alcuni autori gli animali da allevamento costituirebbero un serbatoio dei VRE, selezionati dalla pressione esercitata dagli antibiotici di uso

zootecnico, in particolare dall'avoparcina, farmaco che presenta una totale cross-resistenza con Vancomicina impiegato in Europa dal 1974 al 1997 (Bondi *et al.*, 2001). Inoltre, a differenza di quanto si rileva negli USA, il numero di portatori fecali di VRE in Europa, fuori dal contesto ospedaliero, è molto elevato (fino al 28%); i ceppi infatti sono stati isolati dalle feci di individui sani e di animali, da impianti per lo smaltimento dei rifiuti e da alimenti carnei.

Inoltre è da segnalare la comparsa di stafilococchi aurei vancomicina resistenti a confermare la possibilità di questi batteri di superare le barriere di specie (stafilococchi, listerie, enterococchi) (Bondi *et al.*, 2001).

Ecologia e significato ambientale

Gli Enterococchi sono naturalmente presenti nel suolo e possono essere facilmente isolati anche dalle radici di molte piante. *E. faecalis* e *E. faecium* sono le specie più frequentemente trovate nelle feci umane (*E. faecalis* colonizza l'intestino crasso: $\approx 10^7$ organismi per grammo di feci, ed il tratto urinario), altre specie sono state isolate ma meno frequentemente.

In rapporto alla dieta *E. faecalis* domina nell'intestino umano in Stati Uniti ed Inghilterra, in India e Giappone, *E. faecalis* e *E. faecium* sono invece ritrovati in modo equivalente. Analogamente *E. bovis*, *E. equinus*, *E. avium* non sono esclusive degli animali ma si ritrovano più frequentemente nelle loro feci; non è pertanto possibile differenziare la fonte di una contaminazione fecale in base alla speciazione degli streptococchi (AA.VV., 2000; Crossan, 2000; Ely *et al.*, 2000).

Il valore del rapporto tra Coliformi Fecali e Streptococchi fecali è stato un tempo usato per differenziare l'origine della contaminazione di una risorsa idrica da fecale umana piuttosto che da altri animali a sangue caldo ma il valore del rapporto è stato successivamente messo in discussione. Un rapporto FC/SF >4 sarebbe stato indicativo di contaminazione fecale umana, se $< 0,7$ avrebbe suggerito origine non umana della contaminazione (Standard. Methods precedenti la 17 Ed.). In realtà, i differenti tempi di sopravvivenza delle varie specie del gruppo degli streptococchi (*S. bovis*, *S. equinus* muoiono rapidamente in ambiente acquatico, mentre *S. faecalis*, *S. faecium* sono più resistenti), possono falsare i risultati del rapporto. A ciò va aggiunta la variabile resistenza agli agenti disinfettanti nonché l'utilizzo di terreni diversi per la ricerca degli streptococchi. Ad esempio l'uso di KF Agar comporterebbe, secondo alcuni autori, tra 10 e 90% di falsi positivi per le acque dolci e marine (AA.VV., 2000; Crossan, 2000; Ely *et al.*, 2000).

Nelle Linee Guida dell'OMS 2001, così come dalla Commissione Europea (che lo propone come unico parametro indicatore microbiologico) sono considerati i migliori indicatori di inquinamento fecale e quindi di

rischio sanitario per i bagnanti delle acque di balneazione dolci e salate.

Secondo USEPA, rivestono, unitamente ad *E. coli*, un ruolo di parametro chiave per la valutazione di qualità, avendo dimostrato una migliore correlazione con patologie gastrointestinali associate alla balneazione rispetto ai coliformi fecali. Per altro quest'ultimo parametro continua a rimanere di riferimento in molti stati sia per continuità con i dati storici precedenti che per motivi economici in quanto il metodo approvato dall'EPA per gli enterococchi è più costoso di quello per i coliformi fecali ed il monitoraggio negli USA dipende in parte da programmi di volontariato (AA.VV., 2000; Crossan, 2000; Ely *et al.*, 2000).

Valori guida proposti per le acque di balneazione USA sono di 33 enterococchi/100 mL per le acque dolci e 35 enterococchi/100 mL per le acque marine. Il valore è basato sulla media geometrica degli ultimi 5 campioni per un periodo di 30 giorni durante la stagione balneare.

La normativa italiana, in corso di aggiornamento, prevede attualmente (D.P.R. 470) valori per le acque di balneazione di 100 U.F.C./100 mL. Tale valore verrà presto ridotto del 50%.

Metodi colturali rapidi (MF) per la ricerca degli enterococchi nelle acque

La rapida rilevazione di patogeni ed altri contaminanti microbici negli alimenti e nell'ambiente è spesso critica per assicurare la tutela dei consumatori.

La maggior parte delle procedure analitiche tradizionali prevede l'uso di terreni "presuntivi" seguito da isolamento e test biochimici e sierologici di conferma.

Di recente vengono proposti sistemi di rilevazione ed identificazione più rapidi, convenienti, sensibili e specifici dei metodi convenzionali, almeno in teoria.

In particolare sono disponibili metodi colturali rapidi che consentono l'isolamento ed identificazione di enterococchi in campioni di acqua, su terreni agarizzati, mediante la tecnica delle membrane filtranti, nell'arco delle 24 ore. Questi metodi uniscono alla rapidità, la semplicità di applicazione, dato che non comportano modifiche sostanziali delle procedure analitiche *routinarie*.

In particolare si intende presentare il risultato di una prova di confronto, non equiparabile ad una valutazione vera e propria dei metodi ma indicativa delle loro potenzialità, tra due terreni colturali rapidi per la ricerca degli enterococchi nelle acque con il metodo delle membrane filtranti (Agar Bile Esculina Azide e mEI Agar EPA n.1600/97) ed il terreno Slanetz Bartley Agar (ISO 7899-2:2000) (EPA, 1997; ISO, 2000; Messer e Dufur, 1997).

Si precisa che le formulazioni dei due terreni rapidi citati ed il relativo protocollo analitico sono reperibili sui Metodi Analitici recentemente pubblicati da IRSA-CNR, in appendice ai metodi sugli Enterococchi (IRSA, 1994).

Lo sviluppo di colonie su Agar Bile Esculina Azide che si caratterizzano per la capacità di idrolizzare esculina in presenza di sali biliari consente di enumerare direttamente i microorganismi appartenenti al gruppo enterococchi senza effettuare passaggi successivi. Questo terreno è stato utilizzato presso i laboratori di Arpa Emilia-Romagna Sez. prov.le di Modena, su diverse matrici idriche (superficiali dolci, sotterranee, di rete) fornendo risultati comparabili a quelli ottenibili con i terreni tradizionali. In particolare su oltre un centinaio di campioni di acque potabili, rispetto a KF Agar, il terreno ha mostrato performance perfettamente equivalenti, oltre che un minor numero di falsi negativi. Gli unici due casi di falsi positivi, sviluppati su entrambi i terreni, hanno coinvolto ceppi di *Staphilococcus sciurii* (esculina positivi), ciò comunque suggerisce, in caso di positività su campioni di acque destinate ad uso umano, la opportunità di eseguire comunque il test della Catalasi.

Il terreno suggerito da USEPA mEI Agar (Metodo EPA n.1600 Maggio 1997), rappresenta una versione modificata di un terreno precedentemente in uso negli USA per la ricerca degli Enterococchi, l'mE Agar, il cui utilizzo prevede, così come per lo Slanetz Bartley, la incubazione di 48 ore ed il passaggio delle membrane su un terreno all'esculina per la conferma delle colonie sospette. Le prestazioni del terreno sono state migliorate mediante la introduzione di acido nalidixico, cicloesimide e del cromogeno indoxil β -D glucoside e la tossicità del terreno (Volterra e Aulicino, 1999) è stata ridotta grazie alla riduzione del contenuto in TTC da 0,15 a 0,02 g/L. La presenza del cromogeno consente di evidenziare la attività β -glucosidasi positiva tipica degli enterococchi mediante la formazione di un alone blu intorno alle colonie. Il gruppo di lavoro che ha operato la modifica della formulazione del terreno ha eseguito un notevole lavoro di valutazione del terreno che ha coinvolto numerosi laboratori ed ha comportato analisi su numerosi campioni di differenti matrici idriche. Sul sito internet di USEPA sono disponibili i dati relativi ai risultati dei numerosi confronti interlaboratorio effettuati. ((EPA, 1997; Messer e Dufur, 1997).

Notevole problema connesso all'utilizzo del terreno è la sua irreperibilità, almeno a tutt'oggi, in forma pronta in piastra e la improponibilità dei costi dei singoli componenti da aggiungere al terreno base mE Agar, in particolare del cromogeno che è commercializzato in piccole aliquote a costi molto elevati.

A fronte di queste motivazioni è stata effettuata una piccola prova di confronto tra 18 campioni di acque superficiali dolci, processati in doppio, sui tre terreni oggetto del confronto. Cinque campioni sono stati sottoposti ad un blando trattamento di disinfezione al fine di valutare la capacità di recupero su microorganismi stressati.

I risultati delle conte ottenute dalle diluizioni che mostravano valori compresi tra 10 e 90 colonie confermerebbero *performances* equivalenti tra i due

terreni rapidi ed il terreno di riferimento ISO, anche nel caso di campioni trattati con disinfettante. Il prolungamento della incubazione a 48 ore non modificava significativamente i risultati ottenuti nelle 24 ore. Nelle immagini è possibile vedere l'aspetto delle colonie sui diversi terreni.

I terreni contenenti esculina, questo vale sia per la conferma dello Slanetz Bartley che per Agar Bile Esculina Azide, vanno letti sul retro della piastra (Fig. 1 e 2) e presentano l'inconveniente, noto agli addetti ai lavori, di rendere la lettura impraticabile qualora vengano superati i tempi di incubazione o le conte superino le 80 UFC/membrana. L'inconveniente è parzialmente superabile ripassando la membrana in piastra. (Fig. 3).

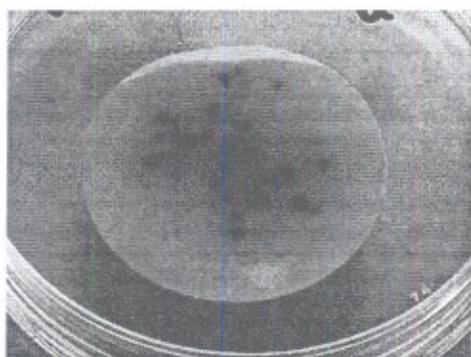


Fig. 1 - Slanetz Bartley su Agar all'Esculina



Fig. 2 - Bile Esculina Azide

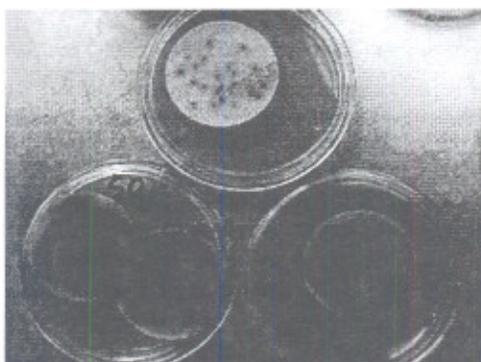


Fig. 3 - Slanetz Bartley su Agar all'Esculina in basso e Bile EsculinaAzide Agar sopra, confronto tra piastre leggibili e non

Viceversa l'mEI Agar consente letture chiare anche dopo 72 ore in quanto le dimensioni e l'aspetto delle colonie non si alterano significativamente nel tempo, almeno così è stato sui campioni esaminati. (Fig. 4).

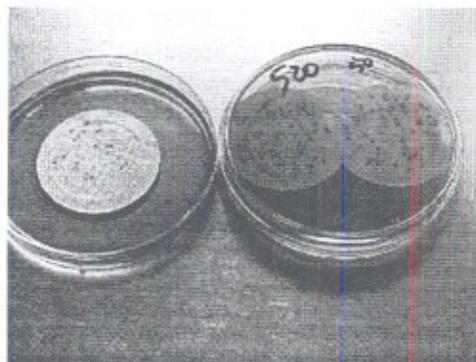


Fig. 4 - mEI Agar

Piuttosto "allarmanti" sono stati invece i risultati ottenuti dalle prove di identificazione effettuate su 36 colonie tipiche e 28 colonie atipiche isolate dai diversi terreni. In particolare, mentre le colonie tipiche sono risultate tutte identificabili come *Enterococcus faecium* o *Enterococcus faecalis* eccetto una colonia di *Enterococcus hirae* isolata sia da Slanetz Bartley che da mEI Agar ed un *Enterococcus avium* da mEI Agar. Le colonie risultate negative sui tre terreni, in particolare negative per l'idrolisi dell'esculina per Slanetz Bartley e Agar Bile Esculina Azide, e negative per la attività β -glucosidasi e quindi nettamente rosa chiaro senza alone blu su mEI Agar; sono risultate, dopo doppio passaggio su Tryptic Soy Agar, tutte positive all'idrolisi dell'esculina, catalasi negative ed identificabili anch'esse come *Enterococcus faecium* o *Enterococcus faecalis* eccetto una colonia di *Enterococcus gallinarum* isolata su tutti e tre i terreni ed un *Enterococcus casseliflavus* da Slanetz Bartley Agar.

Complessivamente il confronto effettuato ha mostrato, pur se su un piccolo numero di campioni di acque superficiali, un'equivalente sensibilità dei due terreni rapidi rispetto al terreno di riferimento ISO, a fronte di tempi di incubazione inferiori e della possibilità di diagnosticare la presenza di Enterococchi senza l'utilizzo di un ulteriore terreno di conferma.

In merito alle specificità, peraltro inaccettabile per tutti e tre i terreni utilizzati, i risultati ottenuti sottolineano, se mai ce ne fosse bisogno, che gli stress cui microorganismi commensali intestinali sono sottoposti una volta introdotti in ambiente idrico, possono alterare significativamente le loro attitudini biochimiche determinando una sottostima (nei campioni esaminati comunque inferiore al 10%) nelle conte il cui significato ovviamente aumenta qualora essi rappresentino indicatori di contaminazione di acque destinate all'uso umano.

A tale proposito rimane sempre valida la "buona abitudine" di effettuare, sui campioni che ne

giustificano l'esecuzione, semplici prove di conferma o, direttamente test di identificazione. Da questo punto di vista la possibilità di ridurre la individuazione di colonie sospette alle 24 ore rappresenta comunque un vantaggio.

Peraltro quando l'effetto dello stress determina sui microorganismi la induzione di uno stato vitale "rallentato" tale da non consentirne temporaneamente la coltivabilità (*non viable cells*) i metodi colturali, siano essi tradizionali o rapidi, divengono comunque insufficienti ed è necessario ricorrere, nei casi in cui l'impiego di tali tecniche sia possibile e giustificabile, alle metodologie che prevedono l'impiego di sonde molecolari, che verranno nel seguito descritte.

In corso di sperimentazione presso la Sezione Provinciale ARPA ER di Rimini sulle acque di mare, si presenta la applicazione di un ulteriore terreno rapido per la enumerazione di enterococchi.

Il decreto legislativo 11 maggio 1999 n.152 prevede, per le acque marine costiere, la ricerca di indicatori di qualità ed analisi da effettuare sulla matrice acqua. Oltre ai parametri definiti macrodescrittori sono elencati altri parametri di supporto per l'interpretazione delle caratteristiche di qualità e vulnerabilità dell'ambiente marino analizzato nonché per la valutazione dei carichi trasportati. Fra questi parametri da ricercarsi sono compresi gli Enterococchi.

Il nostro laboratorio oltre che cercarli con i metodi tradizionali-ISO 7899-2-che prevede la determinazione e l'enumerazione degli enterococchi utilizzando substrati colturali a tutti noti (terreno di Slanetz and Bartley come primo isolamento e conferma in Bile aesculin agar delle colonie tipiche) mediante la tecnica delle membrane filtranti, ha iniziato a utilizzare anche un nuovo substrato cromogenico che prevede la lettura e la conferma presuntiva degli enterococchi in 24 ore a differenza dei metodi tradizionali che richiedono per lo più 48 ore.

Il nuovo terreno utilizzato, denominato E.C.O.A.GAR dal nome degli autori Ottaviani & Agosti, è un terreno cromogenico privo di sodio azide, la cui selettività è ottenuta da una miscela di sostanze antimicrobiche incluse nel terreno di base e con l'aggiunta, dopo sterilizzazione, della Kanamicina. Le caratteristiche differenziali del terreno sono dovute ad una miscela di composti cromogenici per la determinazione di specifici enzimi degli enterococchi.

Secondo gli Autori il terreno si è dimostrato capace di individuare anche ceppi di *Enterococcus* che, privi dei complessi enzimatici specifici (ad esempio per l'idrolisi dell'esculina) non formano colonie tipiche.

Di seguito viene riportata la formulazione tipica del terreno:

E.C.O.A.GAR (g/L)

Peptoni	28,00
Sodio cloruro	5,00
Tampone Fosfati	5,00
Glucosio	1,00
Agenti Emulsionanti	5,70
Agar	15,00
Substrati cromogenici	0,18
Composti selettivi	mg 26

Kanamycin Selective Supplement

Contenuto della fiala (per 500 ML di terreno)

Kanamicina solfato..... mg 10

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

I risultati ottenuti analizzando i vari campioni di acqua marina con i due metodi sono abbastanza sovrapponibili. Solo in due punti di prelievo si sono ottenuti risultati più elevati a favore del metodo tradizionale. Comunque un studio più accurato sia come numero di campioni che in termini di specificità del metodo che utilizza il cromogeno come sistema rivelatore è in corso di sperimentazione.

I primi risultati ottenuti sulle colonie isolate con il terreno E.C.O.A.GAR che crescono dopo incubazione a 37°C per 24 ore con colonie verde-blu e varie sfumature che variano dal verde mela al verde scuro di varie dimensioni, sono stati lusinghieri. Le colonie presunte sono state trapiantate su terreno non selettivo per la prova della catalasi e per la colorazione di gram e su un terreno contenente sangue per la successiva identificazione biochimica mediante metodi miniaturizzati esistenti in commercio. Le colonie testate sono risultate tutte catalasi negative e gram+ di aspetto coccoide ed identificate come *Enterococcus faecium* e *Enterococcus caselliflavus* escludendo per il momento falsi positivi. Non sono state rilevate colonie dall'aspetto grigio viola o rosso magenta da riferirsi secondo gli autori a non enterococchi ma solo rare colonie grigio-biancastre che saranno testate in seguito per escludere la presenza di falsi negativi.

BIBLIOGRAFIA

AA.VV. (2000): "Membrane Filtration Method: Fecal *Streptococcus* and *Enterococcus* Groups", Soil microbiology, BIOL/CSSES 4644.

AA.VV. (2001): "Vancomycin-resistant enterococci (VRE) facts". Report CDC, U.S. Department of Health and human Services.

M. Bondi *et al.* (2001): "Enterococchi Vancomicina-Resistenti (VRE) di provenienza umana ed animale", Atti della X conferenza nazionale OXOID "La valutazione microbiologica degli alimenti risanati"

tramite il calore: tecnologia, biologia ed analisi microbiologiche", Bologna, 16 maggio, 87-95.

D. Crossan (2000): "*Enterococcus*", Soil Microbiology, BIOL/CSES 4684.

E. Ely *et al.* (2000): "*Bacteria indicator of potential pathogens*", Ch 17, U.S. Food and Drug Administration, National Shellfish Sanitation Program (NSSP).

EPA (1997): "*Method 1600: Membrane Filter Test Method for Enterococci in Water*", 821-R-97-004.

ISO (2000): "Water Quality-Detection and Enumeration of Intestinal Enterococci-Part 2: Membrane Filtration Method", 7899-2.

Messer J.W., A.P.Dufur (1997): "A rapid, specific membrane filtration procedure for enumeration of enterococci in recreational water", *AEM*, **64**, 2, 678-680.

D.M. Rollins (2000): "*Enterococcus summary*", Pathogenic Microbiology, BSCI 424, University of Maryland

L.Volterra, F.A.Aulicino (1999): "Streptococchi fecali" e metodi di rilevamento", *Biologi Italiani*, **4**, 34-41.

istituto di ricerca sulle acque - cnr

NOTIZIARIO DEI METODI ANALITICI

Supplemento a Quaderni, 100 (Aut Trib. di Roma n. 17228 del 14.4.1978)

Pubblicazione dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche

Direzione e redazione: Istituto di Ricerca sulle Acque. Via Reno, 1 - 00198 Roma

Tel. 06/8841451 - Fax 06/8417861

Direttore responsabile: R. Passino

Comitato di redazione: L. Campanella, S. Capri, A. Liberatori e R. Pagnotta

Segreteria di redazione: C. M. Blundo

Stampato in proprio

Grafica: P. Fusco

Disegni: M. Ronda

Allestimento e stampa: C. Pastore