



RAPPORTI ISTISAN 14|18

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Metodi analitici di riferimento per la valutazione microbiologica dei fanghi di depurazione e di matrici ad essi assimilabili

A cura di
L. Bonadonna e L. Musmeci



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Metodi analitici di riferimento
per la valutazione microbiologica dei fanghi
di depurazione e di matrici ad essi assimilabili**

A cura di
Lucia Bonadonna e Loredana Musmeci
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
14/18

Istituto Superiore di Sanità

Metodi analitici di riferimento per la valutazione microbiologica dei fanghi di depurazione e di matrici ad essi assimilabili.

A cura di Lucia Bonadonna e Loredana Musmeci

2014, vii, 153 p. Rapporti ISTISAN 14/18

Il volume raccoglie i metodi analitici di riferimento per la determinazione dei parametri microbiologici in fanghi di depurazione e in matrici simili, quali sedimenti, compost, suoli, ecc. Sono state introdotte procedure analitiche per la ricerca di diversi parametri microbiologici utili alla valutazione igienico-sanitaria di questi prodotti. I metodi sono stati elaborati dal Gruppo di Lavoro “Metodi microbiologici per l’analisi di matrici ambientali solide”.

Parole chiave: Analisi microbiologica; Fanghi; Sedimenti, Suoli

Istituto Superiore di Sanità

Microbiological parameters for the analysis of sludge and similar products: analytical reference methods.

Edited by Lucia Bonadonna and Loredana Musmeci

2014, vii, 153 p. Rapporti ISTISAN 14/18 (in Italian)

The volume gathers reference analytical methods for the detection of microbiological parameters in sludge and similar products such as sediments, compost, soils, etc. Analytical procedures have been included for the detection of various microbiological parameters relevant to assessing hygiene and safety of these products. The methods have been produced by the “Microbiological methods for the solid environmental matrices analysis” Working Group.

Key words: Microbiological analysis; Sediment; Sludge; Soil

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

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

Citare questo documento come segue:

Bonadonna L, Musmeci L (Ed.). *Metodi analitici di riferimento per la valutazione microbiologica dei fanghi di depurazione e di matrici ad essi assimilabili*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2014. (Rapporti ISTISAN 14/18).

Legale rappresentante dell’Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



**Il documento è stato elaborato dal Gruppo di lavoro
“Metodi microbiologici per l’analisi di matrici ambientali solide”**

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

Lucia Bonadonna (coordinatore)

Paola Bottoni
Rossella Briancesco
Mattea Chirico
Anna Maria Coccia
Pierluigi Meloni
Rosa Paradiso
Stefania Paduano
Maurizio Semproni

INDICE

Premessa	vii
Fanghi di depurazione e matrici assimilabili	1
0. Generalità.....	1
1. Microrganismi patogeni nei fanghi di depurazione	2
2. Effetto dei trattamenti sui microrganismi	3
2.1. Trattamenti termici	5
2.2. Trattamenti di variazione del pH	5
2.3. Trattamenti biologici	7
3. Monitoraggio dei fanghi di depurazione.....	10
3.1. Valutazione della qualità di fanghi e rifiuti biologici trattati.....	10
3.2. Dimostrazione dell'efficacia dei processi di rimozione microbica.....	11
3.3. Criteri per la selezione di organismi indicatori.....	12
3.4. Organismi test e valutazione dell'efficienza dei processi di trattamento.....	13
Bibliografia.....	15
Lineamenti di tecniche analitiche nella microbiologia ambientale	17
0. Generalità e definizioni.....	17
1. Metodi di analisi	18
1.1. Metodi tradizionali	18
1.2. Metodi rapidi	19
1.3. Metodi molecolari	20
Bibliografia.....	22
Linee guida per le buone pratiche di laboratorio: analisi microbiologica	23
0. Generalità e definizioni.....	23
1. Ambienti di lavoro	23
2. Strumentazione	25
2.1. Autoclavi	26
2.2. Bagni termostatici.....	27
2.3. Bilance.....	27
2.4. Cappe per la sicurezza biologica	27
2.5. Dispensatori.....	29
2.6. Frigoriferi, celle frigorifere, congelatori.....	29
2.7. Incubatori	29
2.8. Incubatori in atmosfera modificata.....	30
2.9. Micropipette	30
2.10. Microscopi.....	30
2.11. Misuratori di pH	31
2.12. Termometri.....	31
3. Materiali.....	31
3.1. Capsule di Petri	31
3.2. Membrane filtranti.....	31
3.3. Terreni di coltura	32
3.4. Vetreria.....	32
Bibliografia.....	33

Determinazione di <i>Escherichia coli</i>	34
0. Generalità.....	34
1. Campo di applicazione.....	35
2. Termini e definizioni	35
3. Campionamento e conservazione del campione	36
4. Metodo ISS F 001A rev.00	36
4.1. Principio del metodo	36
4.2. Strumentazione e vetreria.....	37
4.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	37
4.4. Procedura.....	38
4.5. Espressione dei risultati	40
5. Metodo ISS F 001B rev.00	41
5.1. Principio del metodo	41
5.2. Strumentazione e vetreria.....	41
5.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	42
5.4. Procedura.....	43
5.5. Espressione dei risultati	44
6. Metodo ISS F 001C rev.00	45
6.1. Principio del metodo	45
6.2. Strumentazione e vetreria.....	45
6.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	46
6.4. Procedura.....	48
6.5. Espressione dei risultati	49
7. Metodo ISS F 001D rev.00	51
7.1. Principio del metodo	51
7.2. Strumentazione e vetreria.....	52
7.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	52
7.4. Procedura.....	53
7.5. Espressione dei risultati	54
8. Metodo ISS F 001E rev.00	55
8.1. Principio del metodo	55
8.2. Strumentazione e vetreria.....	55
8.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	55
8.4. Procedura.....	57
8.5. Espressione dei risultati	59
Bibliografia.....	59
Determinazione di <i>Salmonella spp</i>	61
0. Generalità.....	61
1. Campo di applicazione.....	62
2. Termini e definizioni	63
3. Campionamento e conservazione del campione	63
4. Metodo ISS F 002A rev.00	63
4.1. Principio del metodo	63
4.2. Strumentazione e vetreria.....	64
4.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	64
4.4. Procedura.....	67
4.5. Espressione dei risultati	69
5. Metodo ISS F 002B rev.00	69
5.1. Principio del metodo	69
5.2. Strumentazione e vetreria.....	70
5.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	70

5.4. Procedura.....	74
5.5. Espressione dei risultati.....	76
6. Metodo ISS F 002C rev.00	78
6.1. Principio del metodo	78
6.2. Strumentazione e vetreria.....	79
6.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	79
6.4. Procedura.....	81
6.5. Espressione dei risultati.....	82
Bibliografia.....	82
Determinazione degli enterococchi	84
0. Generalità.....	84
1. Campo di applicazione.....	85
2. Termini e definizioni	85
3. Campionamento e conservazione del campione	86
4. Metodo ISS F 003A rev.00	86
4.1. Principio del metodo	86
4.2. Strumentazione e vetreria.....	87
4.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	87
4.4. Procedura.....	88
4.5. Espressione dei risultati.....	90
5. Metodo ISS F 003B rev.00	91
5.1. Principio del metodo.....	91
5.2. Strumentazione e vetreria.....	91
5.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	92
5.4. Procedura.....	93
5.5. Espressione dei risultati.....	94
6. Metodo ISS F 003C rev.00	95
6.1. Principio del metodo	95
6.2. Strumentazione e vetreria.....	96
6.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	96
6.4. Procedura.....	97
6.5. Espressione dei risultati.....	99
Bibliografia.....	101
Determinazione delle spore di <i>Clostridium perfringens</i>	102
0. Generalità.....	102
1. Campo di applicazione.....	103
2. Termini e definizioni	103
3. Campionamento e conservazione del campione	104
4. Metodo ISS F 004A rev.00	104
4.1. Principio del metodo	104
4.2. Strumentazione e vetreria.....	104
4.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	105
4.4. Procedura.....	109
4.5. Espressione dei risultati.....	112
5. Metodo ISS F 004B rev.00	112
5.1. Principio del metodo	112
5.2. Strumentazione e vetreria.....	113
5.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	113
5.4. Procedura.....	115
5.5. Espressione dei risultati.....	117

6. Metodo ISS F 004C rev.00	118
6.1. Principio del metodo	118
6.2. Strumentazione e vetreria.....	118
6.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali	119
6.4. Procedura.....	120
6.5. Espressione dei risultati.....	122
Bibliografia.....	122
Modalità di campionamento e conservazione dei campioni	123
0. Considerazioni generali	123
1. Termini e definizioni	123
2. Confezionamento e trasporto dei campioni	124
2.1. Verbale di campionamento ed etichettatura delle eventuali aliquote e del campione finale	124
2.2. Attrezzature	124
2.3. Modalità operative generali	125
3. Fanghi	125
3.1. Campionamento da cumuli o container	126
3.2. Campionamento da sistemi chiusi e impianti a ciclo continuo e discontinuo.....	126
4. Ammendanti organici	127
5. Suoli.....	127
5.1. Campionamento	129
5.2. Modalità operative.....	130
6. Sedimenti	130
Bibliografia.....	133
Appendice A	
Attrezzature di base per le analisi microbiologiche	135
Appendice B	
MPN: tabelle per il calcolo	147

PREMESSA

Per matrici solide estremamente eterogenee quali fanghi, suoli, ammendanti organici, sabbie e sedimenti l'esecuzione di analisi microbiologiche risulta particolarmente complessa e laboriosa a causa della peculiare natura disomogenea dei prodotti e della capacità di adesione dei microrganismi al particolato che li costituisce. Queste caratteristiche rendono i metodi comunemente utilizzati, formulati e impiegati tradizionalmente più che altro per il conteggio dei microrganismi nell'acqua, il più delle volte inadeguati ed inefficaci per l'esame di questi materiali.

In mancanza di requisiti e metodi ufficiali, i dati di letteratura, in termini di metodologie analitiche, vengono a fornire l'unico supporto tecnico per i disposti normativi che, a livello nazionale, disciplinano le varie tipologie di matrici solide non fornendo tuttavia metodi analitici di riferimento. Per questo motivo, le strutture che operano nel settore richiedono una definizione e armonizzazione delle diverse procedure analitiche al fine di poter disporre di uno strumento applicativo utile, non più interpretabile e soggettivo e aggiornato dal punto di vista tecnico-scientifico.

In questo ambito, il Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità si è impegnato a svolgere un complesso lavoro tecnico per la preparazione dei metodi microbiologici utili per valutare la sicurezza microbiologica di queste particolari matrici. I metodi di analisi sono stati elaborati tenendo conto dei progressi scientifici avvenuti nel settore negli ultimi anni, a supporto di un quadro normativo in evoluzione e delle sue eventuali possibili modifiche future.

Il documento raccoglie quindi le procedure analitiche per l'analisi dei fanghi di depurazione e di matrici ad essi assimilabili e intende rappresentare un riferimento destinato a tutti gli operatori del settore che eseguono attività di controllo igienico-sanitario su questi prodotti.

I metodi proposti includono sia procedure consolidate, e quindi più tradizionali, sia metodi "rapidi" di recente formulazione che, non richiedendo prove di conferma, risultano essere più vantaggiosi sia in termini di riduzione dei tempi analitici sia di prestazioni.

Per ciascun parametro sono stati proposti più metodi. Ciascuno di essi si basa su principi diversi affinché l'operatore possa scegliere quello più adeguato alla tipologia di matrice da analizzare e ai presunti titoli del microrganismo da ricercare.

Dalla valutazione della qualità microbiologica del prodotto è possibile esprimere un giudizio di qualità, definire il conseguente destino di utilizzo e interpretare l'effetto di un determinato eventuale trattamento di sanificazione.

La caratterizzazione microbiologica, indispensabile per realizzare un corretto programma di controllo della qualità di matrici solide come quelle considerate, costituisce un fattore prioritario in un ambito di prevenzione e tutela della salute, nonché di salvaguardia dell'ambiente.

È per questo che il volume acquista un significato estremamente attuale e, in mancanza di metodologie ufficiali, rappresenta uno strumento tecnico utile allo svolgimento di indagini di controllo e ricerca, anche in previsione di eventuali futuri adempimenti normativi.

Loredana Musmeci

*Direttore del Dipartimento di Ambiente
e Connessa Prevenzione Primaria*

FANGHI DI DEPURAZIONE E MATRICI ASSIMILABILI

0. Generalità

Nei fanghi di depurazione e nella frazione organica dei rifiuti può essere presente un'ampia varietà di microrganismi. Ai fini di un razionale e congruo riutilizzo di questi prodotti come ammendanti e fertilizzanti nel settore agricolo è prioritario considerare le implicazioni di carattere sanitario dovute alla potenziale presenza di popolazioni di microrganismi in grado di causare malattie nell'uomo, negli animali e nelle piante.

Parte degli agenti infettivi responsabili di infezioni nell'uomo sono escreti nell'ambiente attraverso le feci e le secrezioni del corpo umano o sono diffusi da animali. Possono essere rinvenuti nell'ambiente nella forma direttamente infettiva, come accade per i virus e per la maggior parte dei batteri, o come forme di resistenza e propagazione ambientale come spore batteriche, cisti di protozoi e uova di elminti e, una volta introdotte nel corpo umano possono attivarsi esplicando, quindi, la propria azione patogena.

In generale, la composizione della flora microbica dei rifiuti organici e dei fanghi varia a seconda della loro origine e delle loro caratteristiche strutturali. Possono essere quindi individuati batteri, virus, funghi, lieviti, protozoi ed elminti.

Relativamente a batteri patogeni, la loro presenza nelle acque reflue e, di conseguenza, nei fanghi di risulta deriva dalle condizioni epidemiologiche ed endemiche della comunità che insiste in quell'area.

La tipologia di virus rinvenibili nei fanghi di depurazione, negli scarti organici e nei reflui di una regione dipende dalle caratteristiche geografiche; tuttavia molti agenti virali sono diffusi nell'ambiente attraverso le deiezioni fecali di animali.

Nelle pratiche di riutilizzo dei fanghi di depurazione i rischi sanitari legati alla presenza di funghi e di lieviti sono di limitata entità e riguardano reazioni di tipo allergico e raramente intossicazioni da micotossine. La presenza di parassiti in questa matrice è da ricondurre principalmente all'apporto di materiale fecale; a seconda del ciclo biologico del parassita, l'uomo e gli animali possono rivestire un ruolo importante come ospiti intermedi o finali.

Tra i microrganismi patogeni responsabili di affezioni del tratto gastroenterico possono essere annoverati gli enterococchi, i coliformi, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Ascaris*, i virus enterici, i protozoi parassiti *Giardia* e *Cryptosporidium*. I funghi e gli attinomiceti, in particolare *Aspergillus fumigatus* e *Faenia rectivirgula*, rinvenibili nel suolo e nei fanghi, possono causare affezioni del tratto respiratorio, mentre patologie cutanee sono ascrivibili a batteri appartenenti al genere *Staphylococcus*.

Se il rischio può essere correlato più facilmente alla presenza di virus e di forme microbiche più resistenti come uova e cisti di metazoi e protozoi e spore batteriche, anche le forme microbiche vegetative, tuttavia, possono trovare condizioni favorevoli per la loro sopravvivenza e moltiplicazione. Infatti, benché nei fanghi possano essere ritrovati i patogeni più comuni, solo alcuni vi si trovano con una frequenza significativa. In particolare, i microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* possono raggiungere elevate concentrazioni, e tra i patogeni compresi in questa famiglia, *Salmonella*, per la sua potenziale maggiore diffusione nella popolazione e per il suo tradizionale ruolo di patogeno enterico, è il microrganismo più comunemente ricercato in questa matrice.

Il problema di rendere igienicamente innocui i fanghi si pone soprattutto, e in modo prioritario, qualora essi vengano sparsi sui suoli dove, esaltando i processi biologici, possono favorire la crescita della vegetazione. Tuttavia, la presenza di batteri, virus e parassiti in essi

inglobati può rappresentare, per l'appunto, un rischio sanitario e una limitazione per questa pratica di recupero. Il rischio è legato sia alla contaminazione di colture vegetali che possono, attraverso la catena alimentare, essere veicolo di trasmissione di malattie sia alla contaminazione dei corpi idrici per effetto dei processi di dilavamento del suolo. Tuttavia, i vari microrganismi apportati a questo comparto tramite i fanghi, vengono ad inserirsi in un equilibrio preesistente non sempre ad essi favorevole. I processi biologici che si svolgono nel suolo sono influenzati in ampia misura dalle condizioni climatiche; infatti suoli neutri o alcalini e umidi, così come anche periodi piovosi e basse temperature, possono allungare i tempi di sopravvivenza dei microrganismi generalmente presenti. È stato ripetutamente osservato che ad alte temperature, in un ambito in cui i valori massimi non sono comunque letali, i tempi di sopravvivenza sono nettamente inferiori, probabilmente anche per un aumento della competizione con la flora autoctona antagonista.

L'analisi microbiologica dei fanghi di depurazione è particolarmente importante in ambito sanitario poiché, come prodotti di risulta derivati dai processi di trattamento dei liquami, costituiscono il concentrato di tutti gli inquinanti presenti nei reflui; si deve tener conto, infatti, che il numero dei microrganismi concentrati nei fanghi supera quello presente nelle acque reflue grezze e, pertanto, la determinazione delle loro caratteristiche microbiologiche, soprattutto se utilizzati a scopo agricolo, assume un ruolo rilevante in campo sanitario.

1. Microrganismi patogeni nei fanghi di depurazione

I fanghi di depurazione contengono microrganismi patogeni e non patogeni diffusi con gli scarichi fognari e con le acque meteoriche e di dilavamento. Negli impianti di trattamento i processi di trattamento riducono il carico microbico dalle acque; con la sedimentazione i microrganismi vanno ad accumularsi nei fanghi di risulta che rappresentano quindi un sito di bioaccumulo.

La maggior parte dei microrganismi presenti nei fanghi è di provenienza umana e animale, quando trattasi di scarichi civili; fanghi originati da reflui derivati da industrie zootecniche, alimentari, ecc. avranno percentuali e tipologie microbiche diverse.

Nei fanghi di depurazione possono essere riscontrati agenti microbici, anche con caratteristiche di patogenicità, quali:

- Virus
Poliovirus, Coxsachievirus, Echovirus, Virus dell'influenza, Adenovirus, Astrovirus, Calicivirus, Coronavirus, Enterovirus, Parovirus, Reovirus, Rotavirus, Norwalk virus, Virus dell'epatite A, Virus dell'epatite B.
- Batteri
Escherichia coli, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Enterococcus* spp, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia* spp, *Aeromonas* spp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Brucella* spp, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter* spp, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Klebsiella* spp, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Pasteurella pseudotuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Proteus* spp, *Providencia* spp, *Listeria monocitogenes*, *Arizona hinshawii*, *Streptococcus* spp.
- Protozoi
Acanthamoeba, *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, *Naegleria fowleri*, *Giardia lamblia*, *Isoospora belli*, *Balantidium coli*, *Sarcocystis* spp, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp.

- Funghi
Aspergillus fumigatus, *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Epydermophyton* spp, *Geotrichum candidum*, *Microsporium* spp, *Phiolophra richardsii*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichophyton* spp, *Trichoderma* spp.
- Elminti
Ancylostoma duodenale, *Ascaris lumbricoides*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Enterobium vermicularis*, *Hymenolepsis nana*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Toxocara cati*, *Toxocara canis*, *Trichuris trichura*.

In Tabella 1 sono riportati gli agenti microbici presenti nei fanghi di depurazione e le concentrazioni, generalmente rilevate di alcuni di essi in fanghi primari e secondari.

Tabella 1. Concentrazione di agenti microbici e di organismi indicatori nei fanghi di depurazione

Categoria	Organismo	Fanghi primari	Fanghi secondari
		Densità (n/g peso secco)	Densità (n/g peso secco)
Virus	Virus enterici	10^2-10^4	3×10^2
	Batteriofagi	10^5	-
Batteri	Coliformi totali	10^8-10^9	7×10^8
	Coliformi fecali	10^7-10^8	8×10^8
	Enterococchi	10^6-10^7	2×10^2
	<i>Salmonella</i> spp	10^2-10^3	9×10^2
	<i>Clostridium</i> spp	10^6	-
	<i>Mycobacterium</i> spp	10^6	-
Protozoi	<i>Giardia</i> spp	10^2-10^3	10^2-10^3
Funghi		10^8-10^{10}	10^8-10^9
Elminti	<i>Ascaris</i> spp	10^2-10^3	10^3
	<i>Trichuris vulpis</i>	10^2	$<10^2$
	<i>Toxocara</i> spp	$10-10^2$	3×10^2

2. Effetto dei trattamenti sui microrganismi

Un processo di sanificazione (igienizzazione) di una matrice per essere ritenuto efficace deve garantire una apprezzabile riduzione di densità dei patogeni presenti e l'assenza di fenomeni di ricrescita microbica.

La riduzione microbica conseguita da un trattamento dipende da fattori intrinseci del processo quali la temperatura, l'umidità e il pH.

Per i virus, ad esempio, i fattori che maggiormente influenzano la sopravvivenza sono l'esposizione al calore, il livello di disidratazione, l'antagonismo microbico, l'irraggiamento e il pH. Pertanto, per la loro inattivazione, sono particolarmente efficaci trattamenti quali la digestione termofila, la pastorizzazione, il trattamento con calce viva, l'irraggiamento termico e il lagunaggio.

Spesso i trattamenti che consentono il raggiungimento dei migliori risultati relativi alla limitazione dei disagi di tipo olfattivo non sono tuttavia i più efficaci in termini di riduzione microbica.

Nel caso dei liquami l'obiettivo primario di un trattamento di igienizzazione è la riduzione del carbonio e dell'ammonio. Contemporaneamente si verifica la riduzione della concentrazione dei patogeni e degli organismi indicatori in misura dipendente dalla tipologia del trattamento applicato. L'effetto della combinazione di più fattori come, ad esempio, la separazione della frazione liquida dal materiale solido a cui è associata la maggior parte dei microrganismi, la predazione, la naturale competizione nutrizionale tra i microrganismi, i cambiamenti di pH e di temperatura e l'esposizione alla luce solare, è responsabile della riduzione del carico microbico.

In Tabella 2 sono riportati i valori di rimozione microbica ottenibili con l'applicazione di alcuni tipi di trattamento fisico ai liquami.

Tabella 2. Riduzione microbica dovuta all'applicazione di vari tipi di trattamenti fisici ai liquami

Tipo di processo	Rimozione (%)
Griglia grossolana (0,1-0,2 mm)	0-5
Griglia fine (0,01-0,1 mm)	10-20
Celle a sabbia	10-25
Sedimentazione semplice	25-75
Sedimentazione indotta chimicamente	40-48

La riduzione che si verifica a carico di batteri e virus in seguito all'applicazione di alcuni tipi di trattamento ai liquami è illustrata in Tabella 3.

Tabella 3. Riduzione di batteri e virus conseguibile con l'applicazione di alcuni processi di trattamento ai liquami

Trattamento	Rimozione (%)		
	Coliformi fecali	<i>Salmonella</i> spp	Virus enterici
Sedimentazione primaria	50-90	50-90	0-30
Filtri gocciolanti	90-95	90-95	90-95
Fanghi attivi	90-99	90-99	90-99
Letto di ossidazione	90-99	90-99	90-99
Stagni di stabilizzazione	4-7 log	99,99-100	99,99-100
Lagunaggio	2-6 log	99-100	99-100

Nel caso dei fanghi di depurazione i processi di igienizzazione permettono la stabilizzazione della matrice per il contenimento degli odori; dall'applicazione di tale processo si ottiene anche la riduzione del carico microbico.

L'efficienza di inattivazione dei patogeni è elevata e dipende dall'estensione del trattamento e dalle condizioni in cui questo si svolge. L'abbattimento microbico che può essere conseguito da alcuni processi di trattamento dei fanghi di depurazione è riportato nella Tabella 4.

Tabella 4. Riduzione microbica dovuta all'applicazione di varie tipologie di trattamento ai fanghi di depurazione

Trattamento	Riduzione (log ₁₀)		
	Coliformi	Virus enterici	Parassiti
Digestione mesofila anaerobica	0,5-4	0,5-2	0
Digestione aerobica	0,5-4	0,5-2	0
Compostaggio	2≥4	2≥4	2->4
Essiccamento	0,5-4	0,5≥4	0,5≥4
Stabilizzazione con calce viva	2≥4	>4	0

2.1. Trattamenti termici

Il trattamento mediante calore oltre che consentire una significativa riduzione della densità dei microrganismi patogeni presenti, a tutto vantaggio della qualità microbiologica della matrice, consente anche una notevole riduzione del volume dei fanghi; il periodo di esposizione al trattamento termico è in funzione della temperatura applicata e della composizione, in termini di specie, della flora microbica presente.

Con la pastorizzazione dei fanghi, trattando la matrice a 70°C per 30 minuti, si ottiene la completa rimozione dei virus enterici e di *Salmonella*.

L'esposizione dei fanghi a 55°C per due ore garantisce invece l'inattivazione delle oocisti di *Cryptosporidium*.

L'effetto di alcuni trattamenti termici sugli organismi indicatori contenuti in fanghi di risulta e in acque reflue è riportato nella Tabella 5.

Tabella 5. Riduzione microbica conseguita da alcuni trattamenti termici applicati a fanghi di risulta e ad acque reflue

Microrganismi	Riduzione microbica (log ₁₀)	
	Fanghi trattati a 80°C per 90 min	Acque reflue trattate a 60°C
<i>E. coli</i>	> 3,6	6
<i>Enterococcus</i> spp	> 2,7	3,4
Clostridi solfito-riduttori	0,3	0,1
Colifagi somatici	0,6	0,8

2.2. Trattamenti di variazione del pH

L'aggiunta di calce viva ad una matrice biologica consente di innalzarne il pH fino ad un valore di circa 12 con conseguente cessazione di attività biologica da parte dei microrganismi presenti.

Alcuni studi dimostrano che il permanere di un fango a pH 12,5 per 2-4 mesi, in seguito a trattamento con calce viva, provoca una riduzione del 98,5% delle uova degli elminti e del 90% dei virus.

L'effetto che l'aggiunta di calce viva può avere sui fanghi disidratati, e il livello di sanificazione conseguibile, dipendono dalla dose di ossido di calcio utilizzata, dalla temperatura e dalla durata del trattamento, come schematizzato in Tabella 6.

Tabella 6. Riduzione del carico microbico di fanghi di depurazione a seguito del trattamento con calce viva

Dose di CaO (%)	°C dopo il 1° g	Riduzione coliformi (log ₁₀)			Riduzione <i>C. perfringens</i> (log ₁₀)				
		4 h	1 g	14 g	forme vegetative			spore	
					4 h	1 g	14 g	1 g	14 g
0	20	-	-	1,3	-	-	0,1	-	0,4
2	20	2,8	3,5	5,3	1,2	1,5	2,0	2,0	>4,0
4	20	3,2	3,2	6,3	1,3	1,8	2,2	>4,0	>4,0
6	20	3,8	5,2	6,3	1,4	1,9	3,0	>4,0	>4,0
6	26	-	5,2	6,3	-	2,2	4,0	>4,0	>4,0
8	20	5,2	3,2	>6,7	1,5	1,7	3,0	>4,0	>4,0
8	28	-	5,6	>6,7	-	1,9	>4,0	>4,0	>4,0
10	20	3,2	6	6,2	1,2	1,7	>4,0	>4,0	>4,0
10	33	-	5,5	6,3	-	2,1	>4,0	>4,0	>4,0
15	20	-	5,5	>6,7	-	2,9	>4,0	>4,0	>4,0
15	39	-	6	>6,7	-	>4	>4,0	>4,0	>4,0

h: ore, g: giorno/i

Secondo alcuni studi il trattamento con calce viva può portare ad una riduzione del 99,7% di *E. coli*, del 99,4% degli enterococchi e del 99,5% delle spore di *Clostridium*; la riduzione conseguita non sarebbe invece soddisfacente per *Mycobacterium* e per le uova di *Ascaris*.

A pH 11,5 tutti i virus sono inattivati e, a valori compresi tra 11,5 e 12,4, si osserva il totale abbattimento di *Salmonella*.

Alcuni studi effettuati su fanghi attivi primari e secondari, disidratati (contenuto solido secco del 25%) e trattati con ossido di calcio in rapporto peso/peso del 12%, in modo da mantenere il pH al valore 12 per almeno due ore, hanno dimostrato elevata efficacia del trattamento nell'inattivazione di patogeni enterici. *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Senftenberg, *S. Typhimurium* e *S. Dublin* erano completamente inattivati con una rimozione logaritmica variabile da 6,1 a 9,7 e solo in un esperimento era sopravvissuta *S. Senftenberg*, sia pure a concentrazioni molto basse. Anche ceppi di *Escherichia coli*, non produttori della tossina specifica *Shigella*-like, erano stati completamente inattivati e una rimozione pari a 6 ordini di grandezza fu osservata per Poliovirus. L'efficacia del trattamento con calce viva sulle oocisti di *Cryptosporidium* si è invece rivelata variabile: in taluni casi la vitalità delle oocisti non era affatto compromessa, in altri era ridotta di due unità logaritmiche.

In Tabella 7 sono riportati i risultati di un'indagine svolta sulla riduzione microbica conseguibile attraverso il trattamento di una matrice organica solida con calce viva.

Tabella 7. Abbattimento microbico conseguibile mediante trattamento di una matrice organica solida con calce viva

Organismo	Riduzione microbica (log ₁₀)
<i>Escherichia coli</i>	4,35-4,76
<i>Listeria monocytogenes</i>	6,75
<i>Campylobacter jejuni</i>	7,23-7,49
<i>Salmonella</i> Senftenberg	4,71-7,95
<i>Salmonella</i> Typhimurium	8,75-9,67
<i>Salmonella</i> Enteritidis	-
<i>Salmonella</i> Dublin	6,84-7,58
Poliovirus	6,50-6,82
<i>Cryptosporidium</i> spp	0-1,98

2.3. Trattamenti biologici

2.3.1. Digestione anaerobica

La digestione anaerobica con produzione finale di biogas è il tipo più comune di trattamento applicato ai fanghi. I fanghi derivanti dalla sedimentazione primaria e secondaria delle acque reflue, accumulati in spessi strati, vengono trasferiti nei digestori anaerobici. Qui i fanghi vengono mescolati *in continuum* e l'aria è progressivamente rimossa grazie al mantenimento della temperatura a 35°C, nel caso della digestione mesofila anaerobica, e a 55°C in quella termofila anaerobica, con un tempo medio di permanenza nel digestore di almeno 21 giorni. Durante questo periodo i batteri naturalmente presenti nei fanghi convertono la materia organica in biogas, una miscela di metano e anidride carbonica che può essere riutilizzata come fonte di energia. I processi di digestione rendono le sostanze nutritive contenute nei fanghi nuovamente disponibili per la nutrizione delle piante.

Affinché i processi di digestione anaerobica abbiano un significativo impatto sulla riduzione microbica e non abbiano luogo fenomeni di corto circuito è essenziale che sia garantita un'esposizione continua di almeno 24 ore alle temperature prefissate, oltre che sia rispettato il tempo di permanenza nel digestore. D'altra parte batteri, virus, parassiti, lieviti e funghi sopravvivono durante la digestione mesofila anaerobica, in grado di garantire soltanto il 99% della riduzione del carico microbico, mentre è la digestione termofila anaerobica ad essere responsabile del 99,99% dell'abbattimento dei patogeni presenti. Pertanto la digestione mesofila anaerobica è indicata per la sanificazione di rifiuti scarsamente contaminati, per rifiuti molto contaminati è invece necessario sottoporre i fanghi a trattamenti addizionali prima del loro riutilizzo in agricoltura.

L'efficacia dei vari processi di digestione sulla riduzione dei virus è riportata nella seguente Tabella 8. Secondo alcuni autori numerosi fattori influenzerebbero il processo: la temperatura, la presenza di enzimi secreti dalla flora microbica, la produzione di ammoniaca.

Tabella 8. Inattivazione di virus nei fanghi di depurazione a seguito di alcuni processi di digestione

Trattamento	Inattivazione di virus (%)
Digestione mesofila anaerobica (30÷35°C)	50-99
Digestione termofila anaerobica (50°C)	99,9999
Digestione termofila aerobica (45°C)	98

La riduzione di *Salmonella* conseguita mediante digestione mesofila anaerobica varia dal 16 al 98%, mentre quella ottenibile mediante digestione termofila anaerobica è pari al 99,8%. Relativamente agli enterococchi, con il primo processo si ottiene una rimozione di 0,05-1 ordine di grandezza, con il secondo di 3-4 ordini.

La digestione termofila anaerobica è inoltre molto efficace nell'inattivazione delle oocisti di *Cryptosporidium*: solo il 10% delle oocisti, infatti, resta vitale dopo 18 giorni di trattamento dei fanghi.

L'impatto di alcuni processi di digestione sulla sopravvivenza degli elminti presenti nei fanghi è riportato in Tabella 9.

In uno studio effettuato da Horan *et al.* tutte le specie patogene addizionate al fango di depurazione subivano riduzione durante la digestione mesofila anaerobica. L'entità dell'abbattimento conseguito era pari a 0,34 log per *C. jejuni*, 2,23 log per *L. monocytogenes*, 3,8 log per *E. coli* e 4,24 log per *S. Senftenberg*.

Tabella 9. Inattivazione degli elminti nei fanghi di depurazione a seguito di alcuni processi di digestione

Trattamenti efficienti		Trattamenti non efficienti	
Digestione termofila aerobica	45°C per 20 giorni 55°C per 2 ore	Digestione mesofila aerobica	Temperatura ambiente (90-95% di uova vitali)
Digestione termofila anaerobica	38°C per 30 giorni 49°C per 10-20 giorni	Digestione mesofila anaerobica	35°C per 10-20 giorni (38-90% di uova vitali)

Un primo ciclo di digestione mesofila anaerobica si era dimostrato efficace anche verso Poliovirus che era abbattuto di 6,2 ordini di grandezza e verso *Cryptosporidium*, ridotto di 3,2 log. L'applicazione di un secondo ciclo di digestione a 15 °C per 14 giorni forniva una rimozione microbica addizionale di 1 log per *E. coli*, di 1,95 log per *S. Senftenberg* e di 0,34 log per *C. jejuni*.

2.3.2. Compostaggio

Nella tecnica del compostaggio la massa dei fanghi non digeriti viene mescolata con scarti verdi per aumentare il contenuto di carbonio e la porosità del materiale. Tutti i sistemi di compostaggio sfruttano l'azione metabolica dei batteri aerobi naturalmente presenti che agiscono stabilizzando la materia organica; il calore sviluppato durante i processi di respirazione batterica fa sì che la massa sottoposta al compostaggio raggiunga temperature di (55÷65)°C. Di solito il processo si protrae per 21 giorni, tuttavia, in funzione del livello di sanificazione finale richiesto, può essere necessaria una seconda fase di maturazione del compost, con allungamento del trattamento fino anche a 3-6 mesi.

L'azione igienizzante del processo di compostaggio è basata sul calore che si genera durante il processo aerobico di decomposizione biologica della sostanza organica e sul fatto che durante le fasi mesofile e termofile la massa compostata si trasforma in un substrato non più idoneo alla crescita e alla sopravvivenza dei batteri. La rimozione dei patogeni è anche legata a fattori quali l'umidità, l'aerazione, il pH, la disponibilità di nutrienti, l'antagonismo dei microrganismi autoctoni e la presenza di antibiotici secreti dai microrganismi stessi.

Il livello di riduzione microbica ottenibile mediante il compostaggio dipende dalla qualità dei materiali di partenza e dai parametri che regolano l'efficienza del trattamento ovvero temperatura, livello di aerazione e tempo di residenza.

Un fango sottoposto a compostaggio è ritenuto microbiologicamente sicuro se è stato compostato per almeno due settimane a 55°C o per una settimana a 65°C.

L'efficienza del processo è maggiore nella riduzione di *E. coli* e di *Salmonella* piuttosto che nell'abbattimento degli enterococchi, come riportato negli studi di De Bertoldi e schematizzato in Tabella 10.

Tabella 10. Riduzione di alcuni microrganismi conseguibile attraverso il compostaggio di rifiuti organici

Riduzione (log ₁₀)	<i>Salmonella</i>	Coliformi fecali	Enterococchi
Minima	0,5	0,68	0,71
Massima	>6	>6	4,72

Il compostaggio è inoltre efficace nella riduzione degli elminti a condizione che il processo sia condotto per almeno 4 ore a (60÷76)°C o per 8 giorni a (60÷70)°C.

In uno studio effettuato su 35 impianti del Regno Unito, caratterizzati da 9 diverse tipologie di trattamento dei fanghi di depurazione, tra cui anche il compostaggio, è stata ampiamente studiata la riduzione microbica di *E. coli*.

Tutti i processi applicati riducevano la concentrazione di *E. coli* al di sotto del limite di risoluzione dei metodi analitici; più del 90% dei dati indicavano riduzioni superiori a 6 unità logaritmiche. Il lagunaggio dei fanghi causava riduzioni microbiche di 5 unità logaritmiche mentre la digestione mesofila anaerobica determinava un abbattimento di *E. coli* oscillante da 1,4 a 2,3 unità logaritmiche, a seconda del contenuto di sostanza solida del prodotto. Nel caso di siti che producevano fanghi con basso contenuto di solidi (2-4% di sostanza secca) il 78% mostrava riduzioni di 1-2 unità logaritmiche.

Le riduzioni di concentrazione di *E. coli* raggiungevano le 2-4 unità logaritmiche se i fanghi di depurazione erano successivamente sottoposti a un processo di disidratazione (Tabella 11). Lo studio dimostrò la grande variabilità degli abbattimenti conseguiti nei vari impianti anche se i processi applicati erano i medesimi.

Tabella 11. Riduzione nella concentrazione di *E. coli* nei fanghi di depurazione sottoposti a vari processi di trattamento

Trattamento	n. campioni	Riduzione di <i>E. coli</i> (log ₁₀)			Riduzione di <i>E. coli</i> fanghi trattati (100 g ⁻¹ peso secco)		
		25 ^{esimo} percentile	Media	95 ^{esimo} percentile	25 ^{esimo} percentile	Media	95 ^{esimo} percentile
Lagunaggio	36	1,47	2,65	6,00	5,08	5,93	8,32
Digestione mesofila anaerobica (fanghi liquidi)	208	1,04	1,39	2,36	7,10	7,41	8,27
Digestione mesofila anaerobica (fanghi disidratati)	93	1,76	2,29	3,64	6,27	6,65	7,46
Vermicoltura	14	4,2	5,12	6,54	3,20	4,50	5,07
Compostaggio	31	5,75	6,71	9,10	1,05	2,43	4,70
Calce viva	32	5,70	7,10	9,05	0	1,45	3,00
Termico	70	6,52	7,14	8,90	0,33	1,67	3,56

In Tabella 12 sono riportate le riduzioni di alcune specie microbiche conseguite attraverso vari tipi di trattamento applicati a rifiuti solidi organici.

Tabella 12. Riduzione logaritmica (\log_{10}) di alcuni microrganismi conseguibile attraverso varie tipologie di trattamento applicate a rifiuti solidi organici

Organismo	Processo				
	Digestione mesofila anaerobica	Pastorizzazione e digestione termofila anaerobica		Compostaggio	
		70°C per 30 min	55°C per 4 ore	55°C per 4 ore	40°C per 5 giorni
<i>Escherichia coli</i>	3,37	7,90	7,90	6,18	6,18
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,23	8,12	6,06	3,10	2,44
<i>Campylobacter jejuni</i>	0,34	6,76	4,56	5,70	5,70
<i>Salmonella</i> Senftenberg	4,18	7,89	6,95	2,39	2,09
<i>Salmonella</i> Typhimurium	-	7,39	6,42	-	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis	-	8,24	8,24	5,68	5,68
<i>Salmonella</i> Dublin	-	-	-	5,58	5,58
Poliovirus	4,46	8,30	8,42	7,85	7,85
<i>Cryptosporidium</i> spp	2,67	1,4	1,4	-	-

3. Monitoraggio dei fanghi di depurazione

Il monitoraggio microbiologico dei fanghi e dei rifiuti organici trattati ha lo scopo di valutare sia la qualità del materiale prima che esso sia in qualche modo riutilizzato sia l'efficacia di un eventuale specifico trattamento per la rimozione dei microrganismi.

3.1. Valutazione della qualità di fanghi e rifiuti biologici trattati

Nell'effettuare un monitoraggio analitico occorre considerare numerosi fattori, primo fra tutti la rappresentatività del campione da sottoporre ad analisi; la scelta, pertanto, dei siti di campionamento e il numero di punti dove effettuare i prelievi saranno subordinati all'eterogeneità della matrice.

Le modalità di trasporto e conservazione del campione, nonché l'efficienza delle procedure analitiche di estrazione, purificazione e rilevamento sono, inoltre, condizioni che incidono fortemente sul risultato e sul giudizio di qualità.

La precisione nella stima dei microrganismi presenti in una matrice dipende dalla precisione con cui il campione è prelevato e trattato. L'errore dovuto alle procedure di campionamento e di trattamento può essere più grande della differenza tra i risultati derivati da ripetute analisi della stessa matrice e per tale ragione a volte anche variazioni del 50-90% dei valori ottenuti possono risultare non significative.

È per questo motivo che quando si considera l'efficienza di un trattamento e si valuta la qualità di un fango o di un rifiuto trattato ci si riferisce agli abbattimenti microbici conseguiti in termini di ordini di grandezza e li si esprime in unità logaritmiche.

Attualmente non sono disponibili documenti standard sulle modalità di campionamento di fanghi e rifiuti trattati ma solo linee guida che tuttavia non contengono informazioni riguardo all'intervallo di precisione da assumere.

Data l'ampia e diversificata gamma di materiali che possono essere prodotti dalle numerose varianti di processo di trattamento (materiali liquidi, pastosi, semi-disidratati) è difficoltoso

definire dei metodi standardizzati di campionamento che siano appropriati per ogni tipologia di impianto. Anche le linee guida per il campionamento del suolo non sono specifiche.

Nella determinazione della qualità di un fango o di un rifiuto organico trattato, molti limiti sono, inoltre, legati alle tecniche per l'analisi microbiologica. Oltre al fatto che solo pochi microrganismi possono essere facilmente monitorati, per alcuni microrganismi sono disponibili solamente metodologie esclusivamente a risposta qualitativa. Poiché, inoltre, le procedure variano a seconda dei microrganismi ricercati, e per uno stesso microrganismo le tecniche di analisi possono basarsi su principi differenti, spesso i risultati analitici non sono espressi nella stessa unità di misura. Per l'evidenziazione dei batteri, ad esempio, si sfrutta la loro capacità di crescere e proliferare su un substrato di coltura ma a seconda del principio su cui si basa la tecnica analitica impiegata (conta diretta di colonie su substrato agarizzato o enumerazione su base statistica) il risultato finale può essere espresso in unità formanti colonie (UFC/mL) o in numero più probabile (MPN/mL). Per i parassiti, invece, poiché la quantificazione si basa sull'esame microscopico diretto, i risultati sono espressi come numero di organismi/L e poiché l'analisi prescinde dal rilevamento di un'attività metabolica, non può fornire informazioni sullo stato di vitalità dei parassiti, la cui determinazione richiede l'applicazione di test addizionali *in vitro*.

Uno dei maggiori limiti delle tecniche microbiologiche è rappresentato dal fatto che la quantificazione viene effettuata su un sistema in scala di laboratorio basato su tecniche *in vitro* che utilizzano substrati di coltura molto ricchi e, di conseguenza, è difficoltoso prevedere il reale comportamento dei microrganismi *in vivo*.

Attualmente la ricerca nel settore è focalizzata sullo sviluppo di metodologie standardizzate robuste e di metodi rapidi che siano specifici, sensibili e tali da garantire una buona valutazione dell'entità di abbattimento microbico, conseguibile mediante l'applicazione di un determinato trattamento.

Studi finalizzati alla valutazione del rischio della presenza di *Salmonella* in suoli fertilizzati con ammendanti derivati dai fanghi di depurazione non hanno evidenziato il microrganismo nel compost utilizzato, né nel materiale grezzo a questo addizionato (segatura, tegumenti vegetali); *Salmonella* è stata tuttavia riscontrata nel suolo successivamente all'applicazione dell'ammendante. I dati dimostrano la scarsa sensibilità dei metodi analitici a basse concentrazioni del microrganismo, quali quelle del compost che, tuttavia, nello specifico caso, ha costituito l'unica presumibile fonte di *Salmonella* nel suolo, ove l'incremento del carico microbico dovuto ai fenomeni di ricrescita e proliferazione batterica, ne ha successivamente reso possibile l'evidenziazione.

D'altra parte, anche la scarsa specificità di un metodo di rilevamento, responsabile di identificazioni improprie, può indurre ad una errata valutazione della qualità di un prodotto o dell'efficienza di un trattamento. È quanto si verifica, ad esempio, nei casi in cui *Klebsiella pneumoniae*, microrganismo ubiquitario nell'ambiente e privo di significato sanitario, viene impropriamente rilevato come *Escherichia coli*, indicatore primario di contaminazione fecale dalla cui presenza e concentrazione, invece, dipende il giudizio di qualità di una matrice utilizzata come ammendante e l'interpretazione dell'effetto di sanificazione di un dato trattamento.

3.2. Dimostrazione dell'efficacia dei processi di rimozione microbica

Per il riutilizzo dei fanghi di depurazione e della frazione organica dei rifiuti è previsto che gli impianti di trattamento ottemperino ad una serie di criteri di validazione dei processi applicati, in termini di stima della riduzione logaritmica che specifici microrganismi conseguono mediante un dato processo, ai fini di ottenere un prodotto finale sanificato.

Per i fanghi di depurazione il processo di trattamento deve essere inizialmente validato mediante il conseguimento di 6 riduzioni logaritmiche di un organismo test quale *Salmonella* Senftenberg W775. Inoltre i fanghi trattati non devono contenere *Salmonella* spp in 50 g di peso secco e il trattamento deve essere tale da assicurare almeno una riduzione di 6 unità logaritmiche di *E. coli*, la cui concentrazione non deve comunque superare il valore di 5×10^2 UFC/g. Nel caso di *E. coli*, una valutazione di tale tipo richiederebbe una matrice iniziale con un livello di contaminazione di almeno 5×10^8 UFC/g, concentrazione eccedente quella che nella maggior parte dei casi è riscontrata nei fanghi non trattati.

La verifica di tali requisiti comporta inevitabilmente la necessità di aggiungere artificialmente microrganismi a titolo noto ad una matrice grezza per poi monitorarne la concentrazione nel corso del processo, tenendo conto di quelli naturalmente presenti nella matrice stessa. Si discute tuttavia sulla validità del criterio di addizione ad una matrice di ceppi standard di laboratorio, la cui diversità fisiologica e metabolica rispetto ai microrganismi autoctoni naturalmente presenti può indurre a considerazioni falsate sull'efficienza di un processo.

Una scala di valutazione del livello di riduzione microbica conseguibile a seguito di un trattamento è riportata in Tabella 13.

Tabella 13. Scala di valutazione della riduzione microbica conseguita a seguito di un trattamento

Livello di riduzione microbica	Entità di riduzione microbica (unità log)	Percentuale di riduzione (%)
Basso	<2	<99
Intermedio	da 2 a 4	99-99,99
Buono	da 4 a 6	99,9>99,9999
Molto buono	>6	>99,9999

3.3 Criteri per la selezione di organismi indicatori

La valutazione dell'efficienza di sanificazione che un processo di trattamento opera su un fango dovrebbe essere basata sul monitoraggio di tutti i microrganismi patogeni presenti. Nella pratica, tuttavia, l'ampia varietà di patogeni e la frequente mancanza di specifiche tecniche di quantificazione e identificazione non rendono ciò possibile. Solo per pochi microrganismi, infatti, come ad esempio *Salmonella*, alcuni virus enterici, cisti di protozoi e uova di elminti sono disponibili tecniche di quantificazione ed è perciò importante definire specifici microrganismi da ricercare nella valutazione dell'efficienza dei trattamenti in termini di qualità microbiologica di una matrice. Da questa esigenza nascono, pertanto, i concetti di organismo indice e di organismo indicatore.

Il ricorso all'uso di organismi indicatori non consente tuttavia una stima diretta della presenza di un dato microrganismo patogeno in una matrice, ma permette, piuttosto, la valutazione della probabilità che esso sia presente.

Gli indicatori più frequentemente utilizzati nella valutazione della qualità dei fanghi e della frazione organica dei rifiuti sono i coliformi, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Enterococcus* e *Clostridium*.

E. coli presenta infatti caratteristiche fisiologiche simili ai patogeni enterici mentre *Clostridium* oltre ad essere molto comune nei fanghi non trattati è molto resistente al calore e la sua rimozione è correlabile a quella di altri batteri sporigeni quali *Bacillus*.

I coliformi fecali e gli enterococchi si sono rivelati buoni indicatori nella valutazione dell'efficienza di sanificazione di compost derivante da rifiuti solidi urbani.

D'altra parte, gli studi attualmente disponibili nei vari Paesi europei non consentono di fare una valutazione adeguata della reale corrispondenza tra le densità degli indicatori e dei microrganismi patogeni in questi tipi di matrici.

E. coli, enterococchi e *Clostridium*, anche se in talune situazioni possono rivelarsi patogeni, hanno dimostrato, in questi tipi di campioni, buone potenzialità nel predire la presenza di materiale fecale e l'efficienza di un processo di trattamento. Occorre inoltre considerare che a seconda della tipologia di trattamento cui una matrice è sottoposta, un indicatore può rivelarsi più idoneo di un altro nella stima dell'efficienza e non è quindi possibile individuare un indicatore "universale".

In Tabella 14 è riportata una rassegna degli abbattimenti conseguibili mediante differenti tipologie di trattamento a carico di vari organismi indicatori.

Tra i batteri candidati ad organismi indice, *C. perfringens*, in quanto sporigeno, è sicuramente il più resistente, tuttavia il basso tasso di inattivazione non consente una stima obiettiva della riduzione conseguibile a seguito di un trattamento.

S. Senftenberg essendo uno dei ceppi di *Salmonella* più termoresistenti, sembra essere un buon microorganismo indicatore. Anche l'elevata resistenza alla temperatura dimostrata da *Enterococcus faecalis* rispetto ad esempio alle uova di *Ascaris*, renderebbe questa specie un buon organismo indicatore.

Tabella 14. Riduzione logaritmica di organismi indicatori in fanghi e rifiuti organici sottoposti a vari processi di trattamento

Organismi??	Trattamento					
	termico	con calce		digestione mesofila anaerobica	digestione termofilica anaerobica	compostaggio
		fanghi	rifiuti organici			
Patogeni				2,00	4,00	0,68≥6,00
Coliformi fecali		1,30 >6,70				0,71-4,00
Enterococchi	>2,70	2,22				
Clostridi solfito-riduttori	0,30	2,30				
<i>C. perfringens</i>		0,10≥4,00				
<i>S. Senftenberg</i>			4,71-7,95	4,18		2,09-2,39
<i>E. coli</i>	>3,60	2,57	4,35-4,76	3,37		6,18
<i>Cryptosporidium</i>			0,00-1,98	2,67		
<i>L. monocytogenes</i>			6,75	2,23		2,44-3,40
<i>C. jejuni</i>			7,23-7,49	0,34		5,70
Virus				0,50-2,00	6,00	
Colifagi somatici	0,6					
Poliovirus			6,50-6,82	4,46		7,85

3.4. Organismi test e valutazione dell'efficienza dei processi di trattamento

Un organismo test è un microorganismo non endogeno che viene addizionato mediante semina ad una matrice di cui si voglia verificare la qualità microbiologica a seguito di un determinato trattamento. Per essere selezionato per la valutazione dell'efficienza dei trattamenti il microorganismo deve esibire taluni specifici requisiti:

- deve essere resistente alle condizioni chimiche e fisiche indotte dal trattamento;
- da un punto di vista analitico deve essere isolabile e coltivabile con facilità;
- non deve di per sé rappresentare un rischio sanitario;
- la sua analisi deve richiedere un basso impegno economico.

Il principio su cui si basa l'utilizzo di organismi test prevede che il microrganismo sia uniformemente addizionato alla matrice ad una concentrazione nota e che il titolo sia nuovamente stimato dopo che la matrice è stata sottoposta al processo di trattamento; il rapporto tra la densità finale e iniziale del microrganismo test consente la valutazione della percentuale di riduzione microbica attribuibile al trattamento.

A dettare la scelta del microrganismo da utilizzare sono specifiche caratteristiche di crescita come, ad esempio, l'elevata resistenza al calore. Affinché la valutazione della qualità igienico-sanitaria di una matrice sia realizzata ad ampio spettro, gli organismi test utilizzati comprendono agenti patogeni umani, animali e anche vegetali (Tabella 15).

Tabella 15. Microrganismi test potenzialmente utilizzabili nella valutazione dell'efficacia dell'applicazione di un trattamento ad una matrice biologica

Microrganismi	Specie
Patogeni umani ed animali	
Batteri	<i>Bacillus</i> spp <i>Campylobacter</i> spp <i>Clostridium perfringens</i> <i>E. coli</i> Enterococchi <i>Listeria</i> spp <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Mycobacterium partuberculosis</i> <i>Salmonella</i> spp <i>Salmonella</i> Senftenberg W775 <i>Yersinia enterocolitica</i>
Virus	Colifagi Coxsackievirus Parvovirus
Parassiti (uova, cisti, oocisti vitali)	<i>Ascaris</i> spp <i>Tenia</i> spp <i>Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium parvum</i>
Patogeni delle piante	
Funghi	<i>Chalara elegans</i> <i>Cylindrocarpon destructans</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Phytophthora cryptogea</i> <i>Plasmodiophora brassicae</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Virus	Beet virus del giallume Virus del mosaico del tabacco Virus della necrosi del tabacco
Nematodi (larve, uova)	<i>Ditylenchus dipsaci</i> <i>Longidorus</i> spp <i>Xiphinema</i> spp

Bibliografia

- Couturier C. Effets de la digestion anaérobie sur les micropolluants et germes pathogènes. *Solagro* 2002;1-5.
- De Bertoldi M, Civilini M, Manzano M. Sewage sludge and agricultural waste hygienization through aerobic stabilization and composting. In: L'Hermite P (Ed.). *Treatment and use of sewage sludge and liquid agricultural wastes*. Proceedings of a CEC Symposium. Athens (Greece), October 1990. New York: Elsevier; 1991.p. 212-26.
- Elissade N, Ganière JP L'hostis M, Legeas M, Demillac R, Carre J, Wiart J, Feix I. *Les germes pathogènes dans les boues résiduaires des stations d'épuration urbaines*. In: Valorisation agricole des boues d'épuration. Guides et cahiers techniques. Leuvin; Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'énergie; 1994.
- Feachem R, Bradley D, Garelick H, Mara D.D. Appropriate technology for water supply and sanitation: Health aspects excreta and sullage management- A state of the art review. The International Bank for reconstruction and development/The World bank, Washington, D.C: John Wiley and Sons; 1983.
- Furet G. Synthèse bibliographique sur l'effet hygienisant du chaulage des boues d'épuration. In: ADEME. *Aspects sanitaires et environnementaux de l'épandage des boues d'épuration urbaines*. Actes des Journées Techniques. Paris (France), juin 5 - 6, 1997. p. 104-111.
- Godfree A, Farrel J. Process for managing pathogens. *J Environ Qual* 2005;34:105-113.
- Horan NJ, Fletcher L, Betmal SM, Wilks SA, Keevil CW. Die-off of enteric bacterial pathogens during mesophilic anaerobic digestion. *Water Res* 2004;38:1113-20.
- Horan NJ, Lowe P. *Pathogens in biosolids - The fate of pathogens in sewage treatment*. (Report 02/SL/06/6). London: UK Water Industry Research; 2002.
- Humphrey N. *A survey of E. coli in UK sludges*. London: UK Water Industry Research Ltd.; 1999.
- ISO 10381-1. Soil quality - Sampling - Part 1: Guidance on the design of sampling programmes. Geneva: International Organization for Standardization; 2002.
- ISO 10381-4. Soil quality - Sampling - Part 4: Guidance on the procedure for investigation of natural, near natural and cultivated sites. Geneva: International Organization for Standardization; 2003.
- Mocè-llivina L, Muniesa M, Pimenta-Vale H, Lucena F, Jofre J. Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(3):1452-6.
- Ponugoti PR, Dahab MF, Surampalli R. Effect of different biosolids treatment systems on pathogen and pathogen indicator reduction. *Water Environ Res* 1997;69:1195-1206.
- Schwartzbrod J. Agents pathogènes dans les boues et impact des différents traitements. In: ADEME. *Aspects sanitaires et environnementaux de l'épandage des boues d'épuration urbaines*. Actes des Journées Techniques. Paris (France), juin 5 - 6, 1997. p. 81-89.
- Stentiford EI, Horan NJ, Lowe P. *Nutrient removal from wastewater*. Lancaster, Pa: Technomic Publishing Company; 1994.
- Strauch D. Pathogenic micro-organisms in sludge. Anaerobic digestion and disinfection methods to make sludge usable as fertiliser. *Eur Water Manage* 1998;1(2):12-26.
- Tchobanoglous G, Burton FL; Metcalf and Eddy Inc. *Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse*. 3rd ed. New York: McGraw-Hill; 1991.
- UNI EN 12579. *Ammendanti e substrati di coltivazione - Campionamento*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2014.
- UNI EN ISO 5667-13. *Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 13: Guida al campionamento di fanghi*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2011.

Ward R, McFeters G, Yeager J. *Pathogens in sewage sludge: Occurrence, inactivation and potential regrowth*. Sandia Report DAND83-0057. Albuquerque, New Mexico: Sandia National Laboratory; 1984.

Whitmore TN, Robertson LJ. The effect of sewage sludge treatment processes on oocysts of *Cryptosporidium parvum*. *J Appl Bacteriol* 1995;78:34-38.

LINEAMENTI DI TECNICHE ANALITICHE NELLA MICROBIOLOGIA AMBIENTALE

0. Generalità e definizioni

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

È noto che non tutti i metodi microbiologici sono idonei all'analisi di tutti i tipi di matrici ambientali. L'analisi di uno stesso parametro in acqua o in una matrice solida può comportare l'uso di metodi diversi che tengano conto delle marcate differenze di natura chimica, chimico-fisica, biologica e organolettica.

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

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

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

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

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

1. Metodi di analisi

Nel volume sono riportati i metodi di analisi di riferimento da impiegare per i controlli delle caratteristiche microbiologiche di fanghi di depurazione, sedimenti, suoli e prodotti assimilabili.

In considerazione dell'evoluzione tecnologica nel campo delle metodologie analitiche, accanto a metodiche basate su tecniche analitiche convenzionali, il volume include metodi rapidi di nuova concezione, vantaggiosi in termini di produttività, precisione e riduzione dei tempi di risposta, criterio di particolare rilevanza in campo sanitario.

1.1. Metodi tradizionali

1.1.1. Tecnica del numero più probabile

La tecnica del numero più probabile (*Most Probable Number*, MPN nota anche come tecnica dei tubi multipli) fornisce una stima statistica della densità batterica del campione analizzato. Si basa, infatti, sulla combinazione dei tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido.

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

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

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

1.1.2. Tecnica della filtrazione su membrana

La metodica della filtrazione su membrana si adatta all'analisi di quasi tutti i tipi di liquidi; per sospensioni particolarmente torbide può essere necessario prefiltrare. Consente di ottenere risultati in tempi più brevi rispetto a quelli richiesti per il metodo tradizionale dell'MPN, ma generalmente più lunghi rispetto alla tecnica miniaturizzata a multi-pozzetto; inoltre permette di esaminare anche grandi volumi di liquidi di buona qualità. Presenta diversi vantaggi consentendo di rilevare direttamente (per conta diretta) il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato, contando le colonie sviluppate su una membrana, semplificando le procedure di laboratorio e abbreviando i tempi operativi anche in funzione dei tempi di incubazione;

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

L'accuratezza del risultato dipende dal numero di colonie contate. È necessario, infatti, che il numero delle colonie sia compreso in limiti leggibili. Un numero di colonie della membrana compreso generalmente tra 20 e 80 e non superiore a 200 fornisce un risultato accettabile e statisticamente accurato.

Il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato si ottiene dall'equazione [1]:

$$\text{UFC}/100\text{mL} = \frac{\text{n. delle colonie contate} \times 100}{\text{mL di campione filtrati}} \quad [1]$$

1.1.3. Tecnica dell'agar germi

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

Un'elaborazione del metodo è rappresentata dal metodo della semina per inclusione, in cui un'aliquota nota di campione viene miscelata al terreno di coltura agarizzato liquefatto e incubato dopo solidificazione. L'ulteriore evoluzione del metodo ha condotto all'uso del metodo di filtrazione su membrana, in cui l'aliquota viene filtrata attraverso una membrana (generalmente di esteri di cellulosa con porosità nominale di 0,45 µm) successivamente posta sul terreno di coltura agarizzato in capsula di Petri.

1.2. Metodi rapidi

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

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

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

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

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

Sebbene negli anni più recenti si siano moltiplicati i metodi enzimatici che usano la tecnica della filtrazione su membrana, quelli che hanno avuto riconoscimenti e approvazioni ufficiali da enti di normalizzazione internazionali (*International Standards Organization*, ISO; *Association of Official Analytical Chemists*, AOAC) o che sono stati normalizzati a livello nazionale (AFNOR, DIN) sono stati i metodi ad inoculo multiplo (MPN a multi-pozzetto).

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

Queste tecniche sono idonee non solo per l'analisi di acque trattate e disinfettate, ma anche per acque contenenti particolato in sospensione, fanghi e prodotti assimilabili.

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

1.3. Metodi molecolari

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

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

1.3.1. PCR

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

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

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

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

1.3.2. Ibridazione con sonde

Le tecniche di ibridazione si basano sul fatto che il DNA è una molecola a doppia elica che può essere denaturata reversibilmente con alcali o calore. La reazione di riassociazione è molto specifica e dipende dalla complementarità delle due catene polinucleotidiche. Sequenze di DNA possono quindi essere riconosciute utilizzando una sonda (probe) polinucleotidica complementare a tratti specifici del genoma che si voglia individuare (bersaglio o target). La sonda si legherà in maniera specifica al bersaglio (preventivamente denaturato) e formerà con esso un DNA duplex ibrido, che potrà essere riconosciuto se la sonda è stata marcata con un rivelatore (tracciante) della reazione (esempio, enzimi o isotopi radioattivi). Uno dei principali

limiti delle sonde molecolari è quello di non poter distinguere tra particelle infettanti. Inoltre la sensibilità delle sonde è troppo bassa per la rilevazione di virus in campioni scarsamente contaminati. Una tipologia particolare di ibridazione con sonde è rappresentato dalla FISH (*Fluorescence In Situ Hybridisation*). Questo metodo implica l'uso di sonde geniche legate a marker fluorescenti, solitamente in grado di appaiarsi all'RNA ribosomale 16S (16S rRNA). I microrganismi concentrati e fissati sono permeabilizzati e miscelati con la sonda. La temperatura di incubazione e l'aggiunta di composti chimici può influenzare il legame tra la sonda e la sequenza target. Poiché il segnale proveniente da una singola molecola di DNA fluorescente all'interno di un microrganismo non ne permette l'individuazione, è necessario selezionare una sequenza target con copie multiple nella cellula. Sebbene vi siano risultati controversi per alcuni patogeni, in condizioni di stress, i microrganismi possono entrare in uno stadio vitale, non replicativo e non coltivabile (VNC). Recenti studi hanno permesso di concludere che i metodi basati sulla PCR e sulla FISH possono permettere di rilevare con maggiore attendibilità, rispetto ai metodi tradizionali, la presenza di patogeni e indicatori batterici vitali, anche nello stadio VNC.

Bibliografia

- American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd ed. Washington, DC: APHA; 2012.
- Bonadonna L. Rapid analysis of microbial contamination of water. In: Tothill IE (Ed.). *Rapid and on-line instrumentation for food quality assurance*. New York: Woodhead Publishing in Food Science and Technology; 2003. p. 161-82.
- Cseke LJ, Kirakosyan A, Kaufman PB, Westfall MV (Ed.). *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. Third Edition. London: CRC Press; 2011.
- Dalla Valle JM. Notes on the Most Probable Number index as used in bacteriology. *Publ Health Rep* 1941;58:299.
- Dutka, BD. *Membrane filtration applications. Techniques and problems*. New York: Marcel Dekker Inc; 1981.
- Lightfoot NF and Maier EA (Ed.). *Analisi microbiologica degli alimenti e dell'acqua. Linee guida per l'assicurazione di qualità*. Pavia: La Goliardica Pavese; 2002.
- Ottaviani M, Bonadonna L, Lucentini L, Pettine P. *Requisiti organizzativi e tecnici dei laboratori di verifica della conformità della qualità delle acque*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/18).

LINEE GUIDA PER LE BUONE PRATICHE DI LABORATORIO: ANALISI MICROBIOLOGICA

0. Generalità e definizioni

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

In relazione a ciò, per inciso, si ritiene opportuno riportare sulla base delle norme ISO le definizioni di:

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

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

1. Ambienti di lavoro

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Strumentazione

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

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

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

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

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

Per ogni apparecchiatura dovrà essere prevista un'apposita "Scheda" che dovrà riportare tutte le informazioni utili sulla provenienza, l'acquisto, l'installazione, il collaudo, le date di

ricevimento e messa in funzione, i riferimenti alle procedure di taratura e manutenzione quando necessari, la loro periodicità e i dati del fornitore e dell'assistenza tecnica.

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

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

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

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

2.1. Autoclavi

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

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

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

– *Verifica del livello dell'acqua*

Prima dell'avvio di un ciclo di sterilizzazione è fondamentale controllare che il livello dell'acqua sul fondo dell'autoclave sia compreso fra l'indice minimo e il massimo riportati sull'indicatore di livello.

– *Verifica funzionale dello sfiato*

Mentre l'autoclave raggiunge la pressione di esercizio, verificare la tenuta delle valvole manuali di sfiato.

– *Verifica dello stato di conservazione della guarnizione del portello*

Verificare che non vi siano rotture, scorie o frammenti; lubrificare con grasso al silicone, evitare l'uso di prodotti chimici.

– *Controllo dell'efficienza dei processi di sterilizzazione*

Utilizzare indicatori biologici come strisce o ampole di spore di *Bacillus stearothermophilus* normalmente disponibili in commercio. Si consiglia di effettuare questo controllo con frequenza almeno mensile.

– *Ispezione della camera*

Ispezionare l'interno della camera e del portello dell'autoclave per controllarne lo stato di conservazione; pulire le superfici interne con detergente idoneo per superfici in acciaio rimuovendo eventuali residui e incrostazioni.

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

2.2. Bagni termostatici

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

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

2.3. Bilance

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

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

2.4. Cappe per la sicurezza biologica

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- spegnere sempre la lampada a raggi UV se l'operatore sta lavorando alla cappa;
- posizionare il vetro frontale, se di tipo a scorrimento, all'altezza fissata per la maggior protezione dell'operatore;
- lasciare in funzione la cappa almeno 10 minuti prima di iniziare a lavorare per stabilizzare il flusso laminare e circa 10 minuti dopo la fine dei lavori per "pulire" da una eventuale contaminazione aerodispersa;
- ridurre al minimo indispensabile il materiale sul piano di lavoro per non diminuire il passaggio di aria;
- eseguire tutte le operazioni nel mezzo o verso il fondo del piano di lavoro;
- non introdurre materiale sotto cappa dopo l'inizio dei lavori; evitare di muovere bruscamente gli avambracci evitare l'utilizzo dei becchi Bunsen. Le alterazioni del flusso laminare così provocate possono infatti provocare la fuoriuscita di agenti biologici, il calore può anche danneggiare il filtro HEPA;
- rimuovere immediatamente rovesciamenti o fuoriuscite di materiale biologico;
- estrarre dalla cappa il materiale potenzialmente infetto in contenitori chiusi a tenuta, puliti all'esterno ed etichettati con il segnale di rischio biologico; disinfettare le apparecchiature prima di rimuoverle dalla cappa;
- pulire e disinfettare la cappa ogni volta che si termina il lavoro togliendo eventualmente anche il piano forato; utilizzare un disinfettante di provata efficacia nei confronti dei microrganismi eventualmente presenti;
- chiudere il vetro frontale, eventualmente accendere la lampada a raggi UV.

2.5. Dispensatori

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

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

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

2.6. Frigoriferi, celle frigorifere, congelatori

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

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

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

Devono essere effettuate con cadenza periodica operazioni che prevedano:

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

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

2.7. Incubatori

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

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

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

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

- ora in cui il rilevamento è stato effettuato;
- valore di temperatura letto sul termometro permanente installato sull'apparecchiatura;
- deviazione evidenziata;

- deviazione massima ammissibile;
- data di effettuazione, data del successivo controllo di taratura e firma di chi l'ha effettuata.

2.8. Incubatori in atmosfera modificata

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

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

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

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

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

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

2.9. Micropipette

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

2.10. Microscopi

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

È opportuno collocare i microscopi in posizione stabile. Per il microscopio ottico si consiglia la dotazione di un sistema per l'osservazione in contrasto di fase e di una serie di obiettivi, in modo da coprire un intervallo di ingrandimenti sufficientemente elevato, e di sistemi per la regolazione dell'intensità luminosa.

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

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

2.11. Misuratori di pH

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

Dopo ogni uso devono essere puliti con acqua distillata.

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

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

2.12. Termometri

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

3. Materiali

3.1. Capsule di Petri

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

3.2. Membrane filtranti

Generalmente per le analisi microbiologiche si utilizzano membrane con pori aventi un diametro di 0,45 μm ($\pm 0,02 \mu\text{m}$) e diametro di 47-50 mm. A causa della loro porosità hanno la capacità di trattenere sulla loro superficie, all'atto della filtrazione, i batteri contenuti in sospensione nel campione analizzato che svilupperanno colonie sulla superficie della membrana, dopo un idoneo periodo di incubazione, per passaggio per capillarità dei principi del terreno colturale.

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

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

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

3.3. Terreni di coltura

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

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

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

– *Controllo della sterilità*

Porre ad incubare una capsula o un tubo contenenti il solo terreno da testare secondo le modalità previste dal metodo analitico, e verificare la completa assenza di crescita batterica e fungina. In caso contrario, scartare tutto il lotto preparato e controllare le procedure di sterilizzazione e preparazione. Da effettuare ad ogni preparazione del terreno;

– *Controllo della fertilità del terreno*

Verificare la sua idoneità alla crescita del microrganismo target. Strisciare sulla superficie del terreno agarizzato o inoculare nel brodo un'ansata di una brodocoltura allestita con un ceppo puro certificato di riferimento. Incubare con le modalità previste dal metodo analitico e verificare la crescita di microrganismi con le caratteristiche morfologiche tipiche. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.

– *Controllo della selettività del terreno*

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

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

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

3.4. Vetreria

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

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

Bibliografia

- American Public Health Association. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 22nd ed. Washington, DC: APHA; 2012.
- ISO 7218/Amd.1. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations*. Geneva: International Organization for Standardization; 2001.
- Lightfoot NF, Maier EA (Ed.). *Microbiological analysis of food and water: guidelines for quality assurance*. Amsterdam: Elsevier Science; 1998.
- Niemelä SI. *Uncertainty of quantitative determinations derived by cultivation of microorganisms*. Helsinki: Mittatekniikan Keskus, Centre for Metrology and Accreditation, MIKES Publication J3; 2002.
- Ottaviani M, Bonadonna L, Lucentini L, Pettine P. *Requisiti organizzativi e tecnici dei laboratori di verifica della conformità della qualità delle acque*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/18).
- UNI CEI 70099. *Vocabolario Internazionale di Metrologia. Concetti fondamentali e generali e termini correlati (VIM)*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.
- UNI EN ISO 17994. *Qualità dell'acqua - Criteri per definire una equivalenza tra metodi microbiologici*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004.
- UNI EN ISO 7218:2013. *Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2013.
- UNI ENV ISO 13843. *Qualità dell'acqua - Guida per la validazione di metodi microbiologici*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2003.

DETERMINAZIONE DI *ESCHERICHIA COLI*

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Escherichia coli* rilevato con i metodi ISS F (001A rev. 00; 001B rev. 00; 001C rev. 00; 001D; 001E rev.00).

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

Matrici quali suolo, fanghi, ammendanti organici, compost, concimi e rifiuti organici in genere, possono contenere microrganismi patogeni che, ricorrenti principalmente nell'apparato gastroenterico, vengono trasmessi attraverso la contaminazione fecale. L'uso in agricoltura di tali materiali contaminati può causare l'insorgere di processi infettivi dovuta alla produzione di alimenti inquinati e l'infezione può essere trasmessa anche ad animali selvatici che vengono ad implementare le sorgenti di diffusione nell'ambiente.

La netta predominanza di *E. coli* rispetto agli altri coliformi nel materiale fecale e la minore sensibilità del microrganismo alle procedure di disinfezione rispetto alla maggior parte dei batteri patogeni enterici, è stata ormai accreditata da tutta la comunità scientifica internazionale; queste caratteristiche rendono questo microrganismo un valido indicatore di qualità in quanto può essere impiegato per monitorare l'effettiva pastorizzazione o l'efficacia dei trattamenti di igienizzazione condotta su tali matrici. Tuttavia, i metodi più classici utilizzati per il suo rilevamento, inadeguati per laboriosità e lunghezza d'esecuzione, poiché non formulati per la sua selezione ma per il rilevamento dell'intero gruppo dei coliformi, comportano lunghi tempi per l'acquisizione della risposta. Oltre a ciò, come per i coliformi, è stata confermata l'ipotesi che parte dei biotipi di *E. coli* presenti in matrici ambientali non sono in grado sia di fermentare il lattosio, sia di produrre gas coltivati in laboratorio. Inoltre, alcuni non sono né termotolleranti, né producono indolo in terreni contenenti triptofano. Diversamente, si è consolidata l'evidenza che un'alta percentuale di *E. coli*, intorno al 98%, ad eccezione dei sierotipi tossigeni, possiede l'enzima β -D-glucuronidasi.

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

E. coli verocitotossigenici, inclusi i ceppi di *E. coli* O157, sono ceppi patogeni di *E. coli* che causano malattie (colite enteroemorragica, sindrome uremica emolitica) a livello umano e animale. Qualora presenti nel fango refluo usato a scopi agricoli, costituiscono un rischio, sebbene minimo, di provocare malattie trasmissibili attraverso la catena alimentare.

Gli *E. coli* verocitotossigenici (VT *E. coli*) producono tossine denominate verotossine (definite VT1 e VT2) o tossine simili a quelle prodotte da *Shigella dysenteriae*, nonché tossine *Shigella*-like (SLT-I e SLT-II), citotossiche per le cellule in culture cellulari. I VT *E. coli* non producono l'enzima β -glucuronidasi; enzima spesso usato come parametro di identificazione per i ceppi di *E. coli* non patogeni.

Il presente capitolo contiene cinque metodi per l'isolamento e la conta di *E. coli* :

- Metodo ISS F 001A rev.00
con tecnica della filtrazione su membrana utilizzando un terreno cromogenico.
- Metodo ISS F 001B rev.00
con tecnica della conta del valore MPN su substrato definito a 97 pozzetti.
- Metodo ISS F 001C rev.00
con tecnica della conta del valore MPN su substrato definito a 96 pozzetti.
- Metodo ISS F 001D rev.00
con tecnica della conta del valore dell'MPN.
- Metodo ISS F 001E rev.00
con tecnica della filtrazione su membrana con terreno cromogenico (per isolamento e conta di *E. coli* verocitotossigenici, compreso *E. coli* O157:H7).

1. Campo di applicazione

Le procedure di analisi descritte possono essere utilizzate per il rilevamento di *E. coli* in campioni di fanghi di depurazione, altri fanghi trattati e non trattati, ammendanti organici e rifiuti organici, compost, suoli anche concimati e sedimenti.

Le metodiche sono particolarmente adatte anche per valutare l'efficienza delle procedure di trattamento volte all'abbattimento di patogeni nei fanghi di depurazione come nelle altre matrici.

2. Termini e definizioni

In relazione al metodo descritto, si applicano i seguenti termini e definizioni:

- *Escherichia coli*: batterio appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, Gram negativo non sporigeno, di forma bastoncellare, lattosio positivo, abile a crescere a 44°C. La maggior parte dei ceppi di *E. coli* produce indolo da triptofano ed è β -glucuronidasi positiva.
- Forme vegetative: batteri in grado di crescere normalmente in terreni liquidi o agarizzati non necessitano di pre-rivitalizzazione.
- Batteri danneggiati sub-letalmente: cellule batteriche stressate, ma non uccise, dal processo di conservazione o dai trattamenti successivi, come per esempio dopo un processo di digestione mesofila anaerobica, di stabilizzazione a calce o di compostaggio, e che quindi non possono essere recuperati.
- Rivitalizzazione: consiste nella stimolazione della crescita vegetativa di batteri danneggiati e per questo non in grado di crescere direttamente su terreno agarizzato.

- Rivitalizzazione quantitativa: consiste nella stimolazione della crescita vegetativa di batteri danneggiati isolati su una membrana filtrante, prima del trasferimento su terreno cromogeno, distinti come singole colonie.
- Unità Formanti Colonia (UFC): è un valore che rappresenta il numero di colonie visibili formate da singole cellule batteriche in crescita su appropriate piastre agarizzate.
- Numero più probabile (*Most Probable Number*, MPN): ogni tubo o pozzetto il cui inoculo contenga anche un solo organismo vitale che produrrà crescita rilevabile e/o una variazione. I singoli tubi o pozzetti del campione sono indipendenti.
- Sospensione primaria: È la prima diluizione effettuata sul campione
- Residuo secco: La porzione di massa secca del materiale ottenuta dopo uno specifico processo di essiccazione. Viene espresso come percentuale oppure in grammi per chilo.

3. Campionamento e conservazione del campione

Durante il campionamento operare attenendosi alle usuali regole di sicurezza. Prelevare campioni mai inferiori a 100 g di peso umido e trasferirli in laboratorio entro le 24 ore successive al prelievo.

Durante il trasporto e lo stoccaggio, per evitare fenomeni di moltiplicazione o inattivazione cellulare, mantenere refrigerati i campioni a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per un massimo di 36 ore.

Tenere i campioni lontano da alimenti e bevande e protetti da eventuali rotture del contenitore.

4. Metodo ISS F 001A rev.00

4.1. Principio del metodo

Tecnica della filtrazione su membrana. Il campione omogeneizzato diluito è filtrato attraverso una membrana e incubato su Membrane Lactose Glucuronide Agar (MLGA), per un periodo iniziale di $4\pm 0,5$ ore a $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Successivamente, si incuba a $(44\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 16 ± 2 ore. La presenza di *E. coli* è rilevata dalla crescita di colonie verdi risultanti dall'idrolisi del substrato cromogenico 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (BCIG).

L'agar medium contiene lattosio, rosso fenolo (come indicatore di acidità) e il substrato cromogenico BCIG.

Colonie β -glucuronidasi-positive e lattosio fermentanti sono da considerare *E. coli*, pertanto non è richiesta alcuna ulteriore conferma. Se ritenuto necessario possono essere comunque eseguiti test di conferma per dimostrare la produzione di acido dal lattosio, la formazione di indolo da triptofano a 44°C e la reazione della citocromossidasi.

La quantificazione delle colonie mediante questo metodo escluderà quella porzione di ceppi di *E. coli* che non sono in grado di crescere a 44°C , o che non riescono a fermentare il lattosio.

Inoltre, un piccolo numero di ceppi di *E. coli* possono non esprimere attività β -glucuronidasica al primo isolamento o essere β -glucuronidasi-negativi.

Questo metodo non è adatto per campioni di fango che sono stati trattati con calce o sottoposti a essiccazione o pastorizzazione, trattamenti che riducono significativamente le concentrazioni batteriche a valori inferiori a 10 cellule vitali di *E. coli* per grammo di peso umido o per quei campioni dove è prevista una intensa riduzione microbica. In questi casi, un arricchimento in terreno liquido ed una stima con il metodo MPN sono da ritenersi più adatti a tale scopo.

I fanghi con un alto contenuto di solidi (>20% p/v) tendono a bloccare la membrana filtrante alle diluizioni più basse o possono mascherare o inibire la crescita degli organismi target abbassando il limite di rilevamento.

Il numero massimo di colonie che dovrebbe essere contato su una singola membrana è approssimativamente pari a 100.

Il metodo è adatto a valutare sia la riduzione logaritmica di *E. coli* dopo trattamento, sia la qualità del prodotto finale.

4.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

4.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi, disponibili in commercio, preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

4.3.1. Soluzione salina peptonata

Composizione	
Peptone	1 g
Cloruro di sodio	8,5 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere gli ingredienti in acqua distillata. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7 \pm 0,2$. Riscaldare agitando frequentemente. Sterilizzare la soluzione in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di 3 mesi in condizioni ottimali.

4.3.2. Membrane Lactose Glucuronide Agar (MLGA)

4.3.2.1. MLGA base

Composizione	
Peptone di soia	40 g
Estratto di lievito	6 g
Lattosio	30 g
Sodio Lauril Solfato	1 g
Rosso fenolo	0,2 g
Sodio piruvato	0,5 g
Agar	10 g
Acqua distillata	1000 mL

Miscelare tutti i componenti e portare a ebollizione agitando continuamente.

4.3.2.2. Soluzione di 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -glucuronide (BCIG)

Composizione	
BCIG, sale monoetilammonio	0,2 g
Etanolo 95%	2,5 mL
Sodio idrossido 1 Mol	0,5 mL

Dissolvere 200 mg di BCIG in una soluzione combinata di etanolo al 95% e idrossido di sodio 1M.

4.3.2.3. MLGA completo

Composizione	
MLGA base	1000 mL
Soluzione BCIG	3 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Aggiungere la sospensione BCIG al terreno base disciolto e miscelare nuovamente. Aggiustare il pH a $7,0\pm 0,5$. Sterilizzare in autoclave a $(121\pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 min. Dispensare circa 10 mL di terreno in capsule di Petri, lasciare solidificare e conservare in frigorifero al buio a $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ e utilizzare entro 7 giorni.

4.3.3. MacConkey Agar

Composizione	
Peptone di soia	20 g
Lattosio	10 g
Cloruro di sodio	5 g
Sali di bile	5 g
Rosso neutro	0,075 g
Agar	12 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere gli ingredienti in 1000 mL di acqua distillata e portare a ebollizione agitando continuamente per dissolvere completamente tutti i componenti.

Aggiustare il pH a $7,0\pm 0,5$.

Sterilizzare in autoclave a $(121\pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 min.

Conservare a $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ per il periodo massimo di 1 mese.

Assicurarsi che la superficie dell'agar sia ben asciutta prima di procedere all'inoculo.

4.4. Procedura

4.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Pesare un sub campione rappresentativo di 25 grammi (peso umido) in un contenitore da 250 mL. Aggiungere un appropriato volume di soluzione salina peptonata (4.3.1.) per ottenere un peso finale di 250 g. Per l'omogeneizzazione del campione utilizzare preferibilmente un sonicatore, o utilizzare un omogeneizzatore tradizionale che permetta una adeguata sospensione del campione.

Nell'eventualità si utilizzi un omogeneizzatore tradizionale, tipo stomacher, porre il campione miscelato nel sacchetto appropriato ed omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità.

La procedura permette la disaggregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

I campioni da analizzare possono contenere quantità variabili di materiale solido; pertanto, alcuni di essi potranno richiedere una fase di centrifugazione e di prefiltrazione prima di essere analizzati per filtrazione. In questo caso, trasferire il contenuto del recipiente in un sacchetto sterile per omogeneizzatore, con o senza filtro integrato per escludere le particelle più grandi, e omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità. Trasferire il contenuto del sacchetto nelle idonee provette da centrifuga e centrifugare per 3 minuti, impostando una velocità di 200÷300 g/minuto.

Decantare in un beaker il supernatante e filtrare attraverso un pre-filtro in fibra di vetro di diametro di 47 mm a porosità nominale di 2,7 µm per rimuovere i detriti più fini. Per evitare intasamenti, versare il campione nell'imbuto da filtrazione lentamente. Una volta terminata la prefiltrazione, trasferire il filtrato in un contenitore sterile da 250 mL.

Per campioni trattati con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ agitando il campione per assicurarne la completa omogeneizzazione. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

4.4.2. Preparazione delle diluizioni dalla sospensione primaria

Il numero di diluizioni da filtrare successivamente varia in base al livello di contaminazione presunto del materiale da sottoporre ad analisi.

Comunemente la sospensione primaria dovrebbe essere ulteriormente diluita in diluizioni seriali da 10^{-1} ÷ 10^{-3} con soluzione salina peptonata (4.3.1.). I campioni con maggiori concentrazioni di batteri richiederanno diluizioni aggiuntive della sospensione primaria fino a 10^{-8} (es. i fanghi non trattati possono contenere titoli di *E. coli* pari a 10^8 ÷ 10^9 per grammo di matrice fresca).

Preparare un quantitativo di provette sterili in base al numero delle diluizioni da effettuare e dispensare in ciascuna di esse 9 mL di soluzione salina peptonata sterile (4.3.1.).

Mediante una pipetta sterile trasferire 1 mL della sospensione primaria nella prima provetta contenente i 9 mL di soluzione salina peptonata e vortexare. Procedere in modo analogo per la preparazione delle altre diluizioni.

4.4.3. Filtrazione su membrana

Aggiungere nel bicchiere filtrante un quantitativo sufficiente di soluzione salina peptonata (15 o 20 mL), prelevare quindi 1 mL del campione diluito e inserire anch'esso nel bicchiere. Filtrare il campione attraverso una membrana quadrettata sterile di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con porosità nominale di 0,45 µm. Mediante pinzette sterili rimuovere la membrana e trasferirla sul terreno agarizzato MLGA (4.3.2.). Ripetere l'operazione per tutte le diluizioni preparate. Come di norma, poggiare la membrana con un movimento rotatorio per prevenire la formazione di bolle di aria. Membrane aggrinzite, strappate o danneggiate, devono essere scartate.

Prima di procedere alla filtrazione della prima diluizione aggiungere un controllo negativo costituito da 1 mL di soluzione salina peptonata sterile. Dopo la filtrazione dell'ultima diluizione, aggiungere un controllo negativo (1 mL di soluzione salina peptonata sterile) e un controllo positivo (sospensione di un ceppo certificato di *E. coli* contenente 10^2 ÷ 10^3 microrganismi/mL).

4.4.4. Incubazione e conteggio delle colonie su substrato cromogeno

Incubare le piastre inizialmente a $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per $4\pm 1/2$ ore e successivamente incrementare la temperatura a $(44\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 16 ± 2 ore. Contare le colonie tipiche verde scuro e per formulare l'espressione dei risultati dovranno essere prese in considerazione soltanto le piastre con intervallo di crescita $10\div 100$ colonie.

Se nessuno dei conteggi ottenuti rientra nell'intervallo sarebbe opportuno considerare conte al di fuori di esso a patto che sia possibile una quantificazione accurata.

4.4.5. Conferma delle colonie

Su MLGA le colonie tipiche di *E. coli* si presentano di colore verde scuro e vanno considerate, pertanto, come *E. coli* confermati.

Le colonie che morfologicamente possono essere ritenute sospetti *E. coli* devono essere subcolturate su MacConkey agar (4.3.3.) con incubazione a $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ per 21 ± 3 ore, procedendo con l'isolamento, a ogni diluizione seminata, di un minimo di due colonie.

Per un'ulteriore conferma possono essere eseguite le classiche prove biochimiche o essere utilizzati i test biochimici miniaturizzati.

4.4.6. Determinazione del peso secco

Il numero di *E. coli* può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione impiegando la metodica descritta nella norma UNI EN 12880:2002; tale determinazione può essere espletata in contemporanea con le analisi microbiologiche.

4.5. Espressione dei risultati

Il calcolo del numero di *E. coli* (presente per g di peso umido del campione originale) si ottiene moltiplicando il numero delle colonie tipiche cresciute sulla membrana per il fattore di diluizione complessivo. L'intervallo di concentrazione dovrebbe essere compreso tra 10 e 100 colonie tipiche (4.4.4.).

Le concentrazioni per g di peso umido sono calcolate secondo la seguente formula:

$$c = n/abv$$

dove:

c è la concentrazione iniziale di *E. coli* espressa numericamente per g di peso umido

n è il numero totale di colonie tipiche di *E. coli* contate sulle membrane selezionate

a è il fattore di diluizione iniziale

b è il fattore di diluizione seriale delle membrane selezionate

v è il volume filtrato attraverso le membrane selezionate;

Esempio

Nello specifico se si ottengono due conte da diluizioni seriali, che rientrano nell'intervallo ottimale $10\div 100$, avendo filtrato volumi pari a 1 mL, per esempio:

Diluizione	Conte
10^{-2}	81 colonie
10^{-3}	15 colonie

applicando la formula si otterrà:

n = numero di colonie totale ($81+15 = 96$)

a = fattore iniziale di diluizione (10^{-1})

b = fattore di diluizione delle diluizioni scelte (10^{-2} e 10^{-3})

v = volume filtrato (1 mL)

$c = 96 / (0,1 \times 0,01 \times 1) + (0,1 \times 0,001 \times 1) = 96 / 0,0011 = 8,7 \times 10^4$ concentrazione di *E. coli* per g di peso umido del campione originale (UFC/g)

Le concentrazioni presenti per g di peso secco del campione sono calcolate in base alla seguente formula:

$$c = (n/abve) \times 100$$

dove

e è il residuo secco (%) del campione umido originale.

5. Metodo ISS F 001B rev.00

5.1. Principio del metodo

Tecnica MPN a multi-pozzetto su substrato definito a 97 pozzetti. Permette di diluire il campione ad un livello tale da ottenere la presenza contemporanea di pozzetti positivi, sviluppo di organismi vitali e pozzetti negativi, privi cioè di crescita batterica. La combinazione dei pozzetti positivi e negativi fornisce la stima della concentrazione dei batteri presenti nel campione originale. Per ottenere un intervallo di concentrazione più ampio l'analisi si esegue su più diluizioni seriali.

Il metodo è un esempio di tecnica a substrato definito, formulazioni chimiche determinate contenenti specifici substrati per il rilevamento di peculiari attività enzimatiche associate a particolari gruppi di organismi. Secondo questo metodo, sono da considerare *E. coli* gli organismi che producono l'enzima β -glucuronidasi. La sua presenza è evidenziata dalla produzione di una fluorescenza blu-bianca quando si osserva con una lampada a luce ultravioletta, ed è il risultato della scissione enzimatica del 4-metil-umbelliferil- β -D-glucuronide (MUG). La maggior parte dei ceppi di *E. coli* produce β -glucuronidasi.

Il metodo consente di determinare la concentrazione di *E. coli* in un determinato volume di fango o matrice ad esso assimilabile, senza l'esecuzione di prove di conferma.

Il campione di fango, o di materiale ad esso assimilabile, viene inizialmente omogeneizzato e poi diluito serialmente. Il terreno disidratato viene disciolto in 99 mL di acqua deionizzata sterile alla quale viene aggiunto 1 mL della diluizione del campione. La sospensione è poi versata in una busta a multi-pozzetto. La busta multi-pozzetto agisce come un sistema a tubi multipli MPN semplificato, dove il numero dei pozzetti esibenti crescita nel terreno sarà dipendente dal numero e dalla distribuzione di organismi nel campione diluito.

La busta multi-pozzetto viene sigillata e incubata alla temperatura di $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per un periodo di 18÷22 ore.

Il numero più probabile di organismi in 1 mL del campione diluito può essere calcolato mediante la tabella di probabilità specifica.

Il substrato e la procedura di base sono riferibili alla norma ISO 9308-2.

5.2. Strumentazione e vetreria

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

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

5.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

5.3.1. Colilert Quanti-Tray™

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

Il terreno si trova anche in commercio in fiale già predosate per l'esame di 100 mL di campione o di una sua diluizione. Il terreno, prodotto sotto forma granulare, si mantiene 24 mesi dalla data di produzione. Conservare le fiale a (4÷25)°C. Nell'esecuzione dell'analisi seguire le istruzioni della ditta produttrice e attenersi alle comuni norme di sicurezza previste per i laboratori di microbiologia. Il prodotto è certificato come non tossico.

5.3.2. Soluzione salina peptonata

Composizione	
Peptone	1 g
Cloruro di sodio	8,5 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere gli ingredienti in acqua distillata. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a 7,0±0,2. Riscaldare agitando frequentemente. Sterilizzare la soluzione in autoclave a (121±3)°C per 15±1 minuti. Conservare a (5±3)°C per non più di 3 mesi in condizioni ottimali.

5.4. Procedura

5.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Il volume e le diluizioni dei campioni dovrebbero essere scelti in modo tale che il terreno non manifesti crescita nella totalità dei pozzetti. Pesare, in un contenitore adeguato, un'aliquota rappresentativa del campione pari a 25 g (peso umido). Aggiungere 225 mL di soluzione salina peptonata (5.3.2.) e trattare il campione mediante sonicazione o utilizzando un omogeneizzatore tradizionale che permetta una adeguata sospensione del campione.

Nell'eventualità si utilizzi un omogeneizzatore tradizionale, tipo stomacher, trasferire il campione diluito in un sacchetto sterile appropriato ed omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità.

La procedura permette la disgregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

Per campioni trattati con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ agitando con cura per assicurarne un'omogeneizzazione completa. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

5.4.2. Preparazione delle diluizioni dalla sospensione primaria

Il numero delle diluizioni del campione da seminare successivamente varia in funzione della concentrazione stimata di *E. coli* nel campione in esame. La sospensione primaria dovrebbe essere diluita in modo seriale da 10^{-1} a 10^{-3} in acqua distillata. Livelli di contaminazione di *E. coli* più alti richiederanno ulteriori diluizioni (10^{-4} - 10^{-5}).

Preparare un quantitativo di provette sterili in base al numero delle diluizioni da effettuare e dispensare in ciascuna di esse 9 mL di acqua distillata sterile.

Mediante una pipetta sterile trasferire 1 mL della sospensione primaria nella prima provetta contenente 9 mL di acqua distillata sterile e mescolare con agitatore tipo vortex. Procedere in modo analogo per la preparazione delle altre diluizioni.

5.4.3. Inoculo e incubazione delle buste multi-pozzetto

Scegliere appropriate diluizioni della sospensione primaria e prelevare da ciascuna di esse 1 mL, aggiungerlo, quindi, ad un contenitore sterile contenente agente antischiuma e 99 mL di acqua distillata. Non utilizzare soluzioni tamponate poiché potrebbero causare reazioni nel terreno.

Sulla base delle istruzioni della ditta produttrice, aggiungere asetticamente al contenitore il contenuto di una busta monodose di terreno Colilert Quanti-Tray (5.3.1.).

Dopo aver chiuso il contenitore, agitare per favorire la completa dissoluzione del terreno. Lasciare, quindi, depositare per pochi minuti per facilitare la dispersione delle bolle d'aria. Versare il contenuto del contenitore nella busta multi-pozzetto e sigillare con la termosigillatrice automatica Quanti-Tray™. Data la particolare natura della matrice, è preferibile utilizzare buste multi-pozzetto a 97 pozzetti (49 pozzetti grandi e 48 pozzetti piccoli) che permettono di ottenere conteggi fino a 2419,6 MPN/100 mL rispetto a quelle a 51 pozzetti che consentono conteggi fino a 200,5 MPN/100 mL.

Evitare l'esposizione della busta multi-pozzetto inocolata alla luce diretta del sole poiché si potrebbero manifestare reazioni false positive.

Il tempo tra l'inoculo della busta multi-pozzetto e l'inizio della fase di incubazione dovrebbe essere il più breve possibile e non superiore alle 2 ore.

Incubare le buste multi-pozzetto sigillate alla temperatura di $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per un tempo non inferiore alle 18 ore e comunque non superiore alle 22 ore.

5.4.4. Interpretazione dei risultati

Dopo l'incubazione, esaminare alla luce ultravioletta, alla lunghezza d'onda di 365 nm, la busta multi-pozzetto e registrare il numero dei pozzetti gialli che manifestano fluorescenza blu-bianca.

In alcuni casi può essere rilevante annotare il numero dei pozzetti gialli che non esibiscono fluorescenza poiché detta colorazione è dovuta alla scissione dell'orto-nitrofenil-β-D-galattopiranoside (ONPG), indicando la presenza di β-galattosidasi e rilevando, quindi, anche la presenza di batteri coliformi nel campione.

5.4.5. Determinazione del peso secco

Il numero di *E. coli* può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente con le analisi microbiologiche.

5.5. Espressione dei risultati

Contare e registrare il numero di pozzetti con reazioni positive (gialli con fluorescenza blu-bianca) va contato e registrato. Calcolare il valore MPN mediante l'appropriata tabella fornita dalla ditta produttrice congiuntamente al prodotto (Appendice B, Tabelle B1.1 – B1.2) Il valore dell'indice MPN di *E. coli* può essere calcolato ed espresso sulla base del peso umido (A) o del peso secco (B).

Seguire quanto sotto riportato come esempio di calcolo.

Se con il sistema MPN a 97 pozzetti, 15 pozzetti grandi e 3 pozzetti piccoli esibiscono colorazione gialla e fluorescenza blu-bianca, dalla tabella probabilistica, il valore MPN di *E. coli* è 21,1 per 100 mL di sospensione esaminata.

Il calcolo del numero di *E. coli* per g di peso umido prende in considerazione il volume e le diluizioni usate.

Per il calcolo per g di peso secco è necessario prendere in considerazione anche la percentuale di sostanza secca. Generalmente i risultati sono riportati come MPN di *E. coli* per g di sostanza secca.

Possono essere applicate, quindi, le seguenti equazioni:

A) Per il calcolo MPN, per g di matrice umida C_u , si avrà:

$$C_u = N \times b \times d/a$$

dove:

C_u è il numero di *E. coli* in 1 g di campione originale umido;

N è l'indice MPN di *E. coli* ottenuto dalla tabella probabilistica (per 100 mL di campione esaminato);

b è il fattore della diluizione iniziale, ovvero sospensione primaria, del campione sospeso in Soluzione Salina Peptonata (in questo caso il fattore è 10);

d è il fattore delle diluizioni seriali scelte e seminate;

a è il volume di campione diluito e inoculato (tipicamente, 1 mL).

Esempio

Se un'aliquota pari a 10 g di campione originale (umido) viene inizialmente diluita 10 volte e al terreno Colilert Quanti-Tray™ si aggiunge 1 mL della diluizione 10^{-3} (campione diluito 1000 volte) e, alla lettura dei risultati, si evidenzieranno 15 pozzetti grandi e 3 pozzetti piccoli con fluorescenza blu-bianca, l'equazione di conseguenza sarà:

$$C_u = 21,1 \times 10 \times 1000/1 = 2,1 \times 10^5$$

Se il contenuto percentuale di sostanza secca del campione originale (umido) è 7,5%, allora si avrà:

$$C_s = C_u \times 100/7,5 = 2,1 \times 10^5 \times 100/7,5 = 2,8 \times 10^6$$

B) Per il calcolo MPN, per g di matrice secca C_s si avrà:

$$C_s = C_u \times 100/e$$

dove:

- C_s è il numero di *E. coli* in 1 g di campione secco;
- C_u è il numero di *E. coli* in 1 g di campione originale umido;
- e è il contenuto percentuale di sostanza secca del campione originale umido.

6. Metodo ISS F 001C rev.00

6.1. Principio del metodo

Tecnica MPN su substrato definito a 96 pozzetti. Permette di diluire il campione ad un livello tale che si ottenga la presenza contemporanea di pozzetti positivi, sviluppo di organismi vitali e pozzetti negativi, privi cioè di crescita batterica. La combinazione dei pozzetti positivi e negativi fornisce la stima della concentrazione dei batteri presenti nel campione originale. Per ottenere un intervallo di concentrazione più ampio l'analisi si esegue su diluizioni seriali.

Il metodo è un esempio di tecnica a substrato definito, formulazioni chimiche determinate contenenti specifici substrati per il rilevamento di peculiari attività enzimatiche associate a particolari gruppi di organismi.

Secondo questo metodo, gli organismi sono da considerare *E. coli* se producono l'enzima β -glucuronidasi a 44°C. La cui presenza è evidenziata dalla produzione di fluorescenza blu del substrato quando si osserva con una lampada a luce ultravioletta, ed è il risultato della scissione enzimatica del 4-metil-umbelliferil- β -D-glucuronide (MUG). La maggior parte dei ceppi di *E. coli* produce β -glucuronidasi.

Il rilevamento e l'enumerazione di *E. coli* richiede le seguenti fasi:

- preparazione e omogeneizzazione della sospensione del campione in soluzione salina peptonata;
- inoculo del campione omogeneizzato diluito in una piastra a 96 pozzetti contenenti il terreno colturale disidratato;
- esame dei pozzetti, mediante l'esposizione alla luce ultravioletta a lunghezza d'onda di 366 nm, dopo il periodo di incubazione, a 44°C, da un minimo di 36 ore ad un massimo di 72 ore. La presenza di *E. coli* è indicata da una colorazione blu fluorescente dovuta all'idrolisi del MUG;
- formulazione dei risultati: le concentrazioni di *E. coli* sono espresse come MPN per grammo di campione originale umido o secco.

6.2. Strumentazione e vetreria

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

- Pipetta multicanale a 8 puntali, graduabile o fissa od ogni altro simile sistema per misurare e distribuire volumi pari a 200 µL in ogni pozzetto;
- Puntali sterili per pipette multicanale;
- Piastre sterili multi-pozzetto a 96 pozzetti da 350 µL, a fondo piatto, non fluorescenti;
- Pellicola adesiva sterile per sigillare le piastre multi-pozzetto;
- Lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm.

6.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

6.3.1. Soluzione Salina Peptonata

Composizione	
Peptone	1 g
Cloruro di sodio	8,5 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere gli ingredienti in acqua distillata. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,0 \pm 0,2$. Riscaldare agitando frequentemente. Sterilizzare la soluzione in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di 3 mesi in condizioni ottimali.

6.3.2. Diluente Speciale per Microplate (noto come DSM)

6.3.2.1. Soluzione di blu di bromofenolo (facoltativa)

Composizione	
Blu di bromofenolo	0,04 g
Etanolo 50%	100 mL

Dissolvere il blu di bromofenolo in 100 mL di etanolo; si utilizza esclusivamente per colorare il DSM e per evitare di confondere la soluzione con l'acqua demineralizzata o distillata.

6.3.2.2. DSM completo

Composizione	
Sale marino sintetico	22,5 g
Soluzione di blu di bromotino	10 mL
Acqua distillata	1000 mL

Dissolvere gli ingredienti in acqua e dispensare aliquote da 18 mL in tubi di adeguata capacità volumetrica.

Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

6.3.3. MUG/EC

6.3.3.1. Soluzione di 4-metil-umbelliferil- β -D-glucuronide (MUG)

Composizione		
MUG (4-metil-umbelliferil- β -D-glucuronide)	0,1	mg
N-N-dimetilformammide	2	mL

Dissolvere il costituente fluorogenico MUG nel N-N-dimetilformammide.

L'N-N-dimetilformammide è un reagente tossico e nocivo se inalato, ingoiato e per contatto con la pelle. È potenzialmente cancerogeno, pertanto va manipolato con cura e va utilizzato esclusivamente sotto cappa chimica. Prima dell'utilizzo leggere attentamente la scheda di sicurezza del prodotto e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

6.3.3.2. MUG/EC completo

Composizione		
Triptone	40	g
Salicina	1	g
Triton \times 100	1	g
Soluzione di MUG	2	mL
Acqua distillata	1000	mL

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

Aggiungere in successione Triptone, Salicina e Triton \times 100 in un litro di acqua distillata, riscaldando in agitazione magnetica, portare quindi a ebollizione fino a completa dissoluzione. Lasciar raffreddare e aggiungere la soluzione MUG (6.3.3.1.).

Aggiustare il pH a $6,9 \pm 0,2$.

Sterilizzare mediante filtrazione con membrane a porosità nominale di $0,2 \mu\text{m}$.

Distribuire $100 \mu\text{L}$ di terreno in ciascuno dei 96 micro-pozzetti della piastra multi-pozzetto (capacità massima pari a $350 \mu\text{L}$) e disidratare immediatamente mediante una camera di disidratazione o sotto cappa di sicurezza biologica.

6.3.4. Reattivo di Kovacs

Composizione		
4-dimetilamminobenzaldeide	5	g
Alcol isoamilico	75	mL
Acido cloridrico 37% ($\rho = 1,18 \text{ g/mL}$)	25	mL

Dissolvere il composto 4-dimetilamminobenzaldeide nell'alcool isoamilico e riscaldare a bagnomaria a 60°C per 5 minuti. Aggiungere quindi lentamente 25 mL di acido cloridrico.

Il reagente sarà pronto per l'uso dopo 6-7 ore (condizione indicata da una colorazione gialla). Conservare in frigorifero e al buio.

Il reagente di Kovacs è nocivo se inalato, irritante per il sistema respiratorio e per la pelle, è pertanto consigliato l'uso di una cappa chimica di aspirazione.

Prima dell'utilizzo leggere attentamente la scheda di sicurezza del prodotto e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

6.4. Procedura

6.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Pesare una aliquota rappresentativa del campione pari a 25 g (peso umido), aggiungere un volume appropriato di soluzione salina peptonata (6.3.1.) affinché il peso finale sia pari a 100 g e trattare il campione mediante sonicazione o utilizzando un omogeneizzatore tradizionale che permetta una adeguata sospensione del campione.

Nell'eventualità si utilizzi un omogeneizzatore tradizionale, tipo stomacher, porre il campione miscelato nel sacchetto appropriato ed omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità.

Aggiungere un volume appropriato di soluzione salina peptonata (6.3.1.) affinché il peso finale sia pari a 100 g ottenendo, pertanto, una prima diluizione 1:4. Collocare la busta nell'omogeneizzatore e omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità. La procedura permette la disaggregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

Per campioni trattati con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ agitando con cura per assicurarne la completa omogeneizzazione. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione.

Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

6.4.2. Preparazione delle diluizioni dalla sospensione primaria

Preparare la diluizione 1:2 in DSM (6.3.2.2.) così come le successive diluizioni seriali decimali da 1:20 a 1:2.000.000 e procedere come segue:

- agitare vigorosamente la sospensione primaria per operare una quanto più possibile omogeneizzazione;
- trasferire immediatamente, con una pipetta sterile, 18 mL della sospensione omogenea in una provetta contenente 18 mL di DSM ottenendo così la diluizione 1:2;
- sostituire la pipetta e trasferire 2 mL della prima diluizione in una nuova provetta contenente 18 mL di DSM ottenendo quindi la diluizione 1:20;
- agitare la nuova diluizione per omogeneizzare e da questa seconda provetta operare la terza diluizione 1:200, trasferendone, sempre sostituendo la pipetta, 2 mL in una nuova provetta contenente 18 mL di DSM;

Continuare fino a raggiungere la diluizione 1:2.000.000.

6.4.3. Inoculo e incubazione delle piastre multi-pozzetto

Seguendo le istruzioni della ditta produttrice, scartare la diluizione 1:2 e inoculare una piastra multi pozzetto contenente terreno MUG/EC (6.3.3.), distribuendo ciascuna delle diluizioni da 1:20 a 1:2.000.000 in 16 pozzetti consecutivi.

Iniziare l'inoculo con la diluizione 1:2.000.000 e mediante una pipetta multicanale a 8 puntali sterili, distribuirne 200 μ L in 16 pozzetti della piastra multi-pozzetto.

Operare, quindi, in modo identico per tutte le altre diluizioni (1:200.000, 1:20.000, ecc.) utilizzando per ciascuna delle diluizioni successive le 2 colonne consecutive a 8 pozzetti della piastra multi-pozzetto. Le ultime due colonne a 8 pozzetti della piastra dovranno corrispondere alla diluizione 1:20.

In alternativa qualunque altro sistema adeguato può essere utilizzato per distribuire 200 μ L per pozzetto di ciascuna diluizione.

Coprire quindi con l'apposita pellicola adesiva e incubare a $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ per un periodo minimo di 36 ore a un massimo di 72 ore.

Manipolare con cura le piastre multi-pozzetto ed evitare accidentali ribaltamenti.

6.4.4. Interpretazione dei risultati

Dopo l'incubazione esporre ogni piastra multi pozzetto, coperta con la pellicola adesiva, a luce ultravioletta a lunghezza d'onda di 366 nm.

Annotare per ciascuna diluizione il numero dei pozzetti positivi blu-fluorescenti.

Sollevare la pellicola e mediante una pipetta multicanale ad 8 puntali sterili distribuire 15 µL di reattivo di Kovacs in ciascun pozzetto positivo. Attendere 1-2 min per il cambiamento di colorazione.

Annotare per ciascuna diluizione il numero dei pozzetti positivi in cui si determina un menisco rosso sulla superficie.

Considerare come positivi sia i pozzetti blu fluorescenti che quelli con anello rosso.

6.4.5. Determinazione del peso secco

Il numero di *E. coli* può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente con le analisi microbiologiche.

6.5. Espressione dei risultati

6.5.1. Determinazione del numero caratteristico (NC)

Annotare il numero dei pozzetti positivi per ciascuna delle 6 diluizioni inoculate e individuare l'NC corrispondente secondo le istruzioni contenute nella norma UNI EN ISO 8199 per il calcolo del valore MPN.

L'NC corrisponde al numero dei pozzetti positivi delle ultime 3 diluizioni, che danno come risultato un numero di pozzetti positivi, come nello schema seguente:

Esempi per la determinazione dell'NC

Diluizione	1/20	1/200	1/2000	1/20000	1/200000	1/2000000	NC
Esempio							
a	16	16	9	3	0	0	16/9/3
b	16	16	9	7	1	0	9/7/1
c	12	5	0	0	0	0	12/5/0
d	0	1	0	0	0	0	0/1/0

Quando possibile, scegliere 3 diluizioni seriali che risultino né tutte positive e né tutte negative. Se ciò non fosse possibile, la cosa migliore sarà scegliere 3 diluizioni con risultati positivi piuttosto che con risultati negativi (esempi a e b). Se meno di 3 diluizioni danno risultati positivi, partire dalla diluizione contenente la concentrazione più alta e seguire con le 2 diluizioni successive (esempio c). Se si verifica il caso che ci siano solo pozzetti positivi per una delle diluizioni seriali, partire da questa diluizione e selezionare la diluizione precedente e quella successiva (esempio d).

6.5.2. Calcolo del valore dell'MPN e dell'intervallo di confidenza

L'MPN è una stima statistica della densità dei microrganismi, assunta a corrispondere alla distribuzione probabilistica di Poisson in un volume inoculato. Al valore MPN sono attribuiti intervalli di confidenza (IC al 95%).

Calcolare il valore MPN mediante l'appropriata tabella fornita dalla ditta produttrice congiuntamente al prodotto.

Il valore del numero MPN corrispondente all'NC individuato può essere ottenuto dall'apposita tabella MPN fornita assieme al prodotto commerciale dalla ditta produttrice.

Procedere quindi individuando l'MPN intermedio (MPN_i) derivandolo dall'NC corrispondente nella tabella.

Il valore MPN finale per mL di sospensione, tenendo in considerazione i fattori di diluizione corrispondenti all'NC, deve essere calcolato dall'MPN intermedio (MPN_i) come segue:

- se NC corrisponde alle diluizioni 1:20; 1:200 e 1:2.000,
l'MPN per mL di sospensione primaria corrisponde all'MPN_i (MPN/mL = MPN_i);
- se NC corrisponde alle diluizioni 1:200; 1:2.000 e 1:20.000,
l'MPN per mL di sospensione primaria corrisponde all'MPN_i moltiplicato per un fattore 10 (MPN/mL=10 × MPN_i);
- se NC corrisponde alle diluizioni 1:2.000; 1:20.000 e 1:200.000,
l'MPN per mL di sospensione primaria corrisponde all'MPN_i moltiplicato per un fattore 100 (MPN/mL =100xMPN_i);
- se NC corrisponde alle diluizioni 1:20.000; 1:200.000 e 1:2.000.000,
l'MPN per mL di sospensione primaria corrisponde all'MPN_i moltiplicato per un fattore 1000 (MPN/mL = 1000 × MPN_i).

Il risultato per grammo di peso umido si calcola quindi secondo la seguente formula:

$$C_u = N \times V/p$$

dove:

- C_u è la concentrazione di *E. coli* in 1 g di campione originale umido;
- N è l'indice MPN di *E. coli* ottenuto come spiegato nei precedenti punti 1÷4 per mL di sospensione primaria;
- V è il volume della sospensione primaria, ovvero 100 mL;
- p è il peso del campione analizzato, ovvero 25 g.

Il risultato per grammo di peso secco si calcola quindi secondo la seguente formula:

$$C_s = C_u \times 100/e$$

dove:

- C_s è la concentrazione di *E. coli* in 1 g di campione secco;
- C_u è la concentrazione di *E. coli* in 1 g di campione originale umido;
- e è il contenuto percentuale di solidi secchi del campione originale umido.

Per utilità, si riporta un esempio di calcolo:

1:20	16 pozzetti positivi su 16
1:200	16 pozzetti positivi su 16
1:2.000	12 pozzetti positivi su 16
1: 20.000	5 pozzetti positivi su 16
1:200.000	0 pozzetti positivi su 16
1:2.000.000	0 pozzetti positivi su 16

In questo esempio l'NC è 16/12/5 corrispondente alle diluizioni 1:200; 1:2.000; 1:20.000 e il corrispondente valore MPN_i nella tabella statistica, è 1.758,2/mL, con IC aventi un limite inferiore di 1.018,2/mL e uno superiore di 3.036,2/mL.

Il valore MPN della sospensione è quindi 17.582/mL (limite inferiore = 10.182/mL; limite superiore = 30.362/mL).

Il risultato per grammo di peso umido quindi sarà:

$$70.328 \text{ E. coli MPN/g}_u$$

(limite inferiore=40.728 MPN/g_u; limite superiore 121.448 MPN/g_u)

Se nessuno dei pozzetti risulta positivo, esprimere il risultato nella seguente forma:

$$< n/\text{mL}$$

dove:

n rappresenta il valore MPN per 1 pozzetto positivo alle diluizioni impiegate.

Se tutti i pozzetti sono positivi, esprimere il risultato come segue:

$$> n/\text{mL}$$

dove:

n rappresenta il valore MPN più basso per tutti i pozzetti positivi alle condizioni di diluizione impiegate.

7. Metodo ISS F 001D rev.00

7.1. Principio del metodo

Tecnica della conta del valore dell'MPN. È idoneo per valutare la riduzione logaritmica di *E. coli*, avvenuta attraverso un processo di trattamento, come anche per determinare la qualità microbiologica del prodotto finale. L'essenza del metodo MPN è diluire il campione ad un grado tale da ottenere la presenza contemporanea di tubi positivi, sviluppo di organismi vitali e tubi negativi, privi di crescita batterica. L'inoculo nei tubi e il numero dei tubi con conseguente crescita batterica permetteranno la stima della concentrazione nel campione originale. Al fine di ottenere stime superiori a un ampio intervallo di concentrazioni si possono utilizzare diluizioni seriali incubando tubi con più diluizioni. L'MPN è il numero che rende il risultato osservato più probabile.

Nel contesto di questo metodo sono da considerare *E. coli* i microrganismi che sono in grado di idrolizzare il 4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide (MUG) quando crescono alla temperatura di 44°C in uno specifico terreno liquido e producono indolo da triptofano e gas dal lattosio.

Il rilevamento e l'enumerazione di *E. coli* richiedono le seguenti fasi:

- preparazione della sospensione primaria del campione in soluzione salina;
- allestimento di diluizioni seriali dalla sospensione primaria nello stesso diluente (da 10⁻¹ a 10⁻⁷);
- trasferimento di un millilitro da ciascuna diluizione in tre serie di tubi contenenti 9 mL di brodo al lauril solfato addizionato con MUG;
- incubazione a (44±1)°C per 40±4 ore;
- rilevamento della produzione di gas, della fluorescenza e della formazione di indolo;
- quantificazione mediante la tecnica MPN.

7.2. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A) è necessaria una lampada di Wood a 366 nm.

7.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

7.3.1. Soluzione salina di NaCl 0,9% p/V

Composizione	
Cloruro di sodio	9 g
Acqua distillata	1000 mL

Miscelare il cloruro di sodio in acqua distillata fino a completa dissoluzione. Disporre volumi di 180 mL in flask da 500 mL e distribuire 9 mL in tubi di coltura. Aggiustare il pH a $7,0 \pm 0,2$. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 2 min.

7.3.2. Brodo al lauril solfato con MUG

Composizione	
Triptosio	20 g
Lattosio	5 g
Cloruro di sodio	5 g
Sodio Lauril Solfato	0,1 g
Di-potassio idrogeno fosfato	2,75 g
Potassio di-idrogeno fosfato	2,75 g
L-Triptofano	1 g
4-metil-umbelliferil- β -D-glucuronide (MUG)	0,1 g
Acqua distillata	1000 g

Miscelare con cura i componenti in acqua distillata riscaldando a bagnomaria. Aggiustare il pH a $6,8 \pm 0,1$ mediante l'aggiunta di idrossido di sodio 1 mol/L. Distribuire 9 mL della soluzione ottenuta in tubi e inserire le campanelle di Durham in ciascun tubo.

Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 min.

7.3.3. Reattivo di Kovacs

Composizione	
4-dimetilamminobenzaldeide	5 g
Alcol isoamilico	75 mL
Acido cloridrico 37% ($\rho = 1,18\text{g/mL}$)	25 mL

Dissolvere il composto 4-dimetilamminobenzaldeide nell'alcool isoamilico e riscaldare a bagnomaria a 60°C per 5 minuti. Aggiungere quindi lentamente 25 mL di acido cloridrico.

Il reagente sarà pronto per l'uso dopo 6-7 ore (condizione indicata da una colorazione gialla). Conservare in frigorifero e al buio.

Il reagente di Kovacs è nocivo se inalato, irritante per il sistema respiratorio e per la pelle, è pertanto consigliato l'uso di una cappa chimica di aspirazione. Prima dell'utilizzo leggere attentamente la scheda di sicurezza del prodotto e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

7.3.4. Soluzione di NaOH 1M

Composizione		
Iodossido di Sodio	40	g
Acqua distillata	1000	mL

Dissolvere l'idrossido di sodio in acqua distillata agitando con estrema attenzione data la reazione esotermica che si determina.

L'idrossido di sodio è corrosivo ed è consigliabile maneggiare il composto con guanti e occhiali protettivi. Prima dell'utilizzo leggere attentamente la scheda di sicurezza del prodotto e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

7.4. Procedura

7.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Porre 20 g di campione originale (peso umido) in 180 mL di soluzione salina NaCl 0,9% (7.3.1.) e omogeneizzare preferibilmente mediante sonicazione. In alternativa omogeneizzare lasciando la miscela in agitazione a 150 rpm per 20 ore a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Un tempo di agitazione pari a 20 ore è raccomandato per tutte queste tipologie di campioni; nel caso di campioni omogenei, per esempio fanghi di depurazione, il tempo di agitazione può essere ridotto ma mai al di sotto dei 30 min. La procedura permette la disaggregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

Per campioni trattati con calce, portare il pH a $7,0\pm 0,5$ agitando con cura per assicurarne la completa omogeneizzazione. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

7.4.2. Preparazione delle diluizioni dalla sospensione primaria

Molteplici diluizioni seriali del campione omogeneizzato (sospensione primaria) potrebbero essere richieste per garantire, al contempo, la presenza di tubi positivi e negativi.

Il numero delle diluizioni del campione da seminare successivamente varia in funzione della concentrazione di *E. coli* prevista nel campione stesso. Solitamente, la sospensione primaria dovrebbe essere diluita in modo seriale da 10^{-1} a 10^{-7} in soluzione salina sterile (7.3.1.); una scala di diluizione fino a 10^{-4} dovrebbe comunque essere sufficiente per matrici trattate.

Preparare, pertanto, un quantitativo di provette sterili in base al numero delle diluizioni da effettuare e dispensare in ciascuna di esse 9 mL di soluzione salina (7.3.1.).

Mediante una pipetta sterile trasferire 1 mL della sospensione primaria nella prima provetta contenente 9 mL di NaCl 0,9% e mescolate con agitatore tipo vortex. Procedere come sopra descritto per preparare tutte le diluizioni necessarie.

7.4.3. Inoculo e incubazione dei tubi

Inoculare 1 mL della sospensione primaria, da considerare come la diluizione 10^{-1} , e delle successive diluizioni (10^{-2} ÷ 10^{-7}) nelle rispettive serie di tre tubi contenenti la campanella Durham e il brodo al lauril solfato con MUG (7.3.2.).

Incubare tutte le triplete inoculate a $(44\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 40 ± 4 ore.

7.4.4. Interpretazione dei risultati e conferma

Osservare la formazione di gas nelle campanelle di Durham e considerare come positivi tutti i tubi in cui essa si sia manifestata.

Aggiungere 0,5 mL di NaOH 1M ad ogni tubo gas-positivo: esaminare la fluorescenza alla luce ultravioletta alla lunghezza d'onda di 366 nm e considerare come positivi tutti i tubi che esibiscono fluorescenza.

Aggiungere il reattivo di Kovacs in quantità tale da formare uno strato di circa 0,5 cm sulla superficie di tutti i tubi positivi per formazione di gas e fluorescenza; osservare, quindi, il cambiamento di colore (rosso ciliegia dopo 1-2 min) e considerare positivi tutti i tubi in cui si sia prodotto un anello rosso sulla superficie.

7.4.5. Determinazione del peso secco

Il numero di *E. coli* può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente con le analisi microbiologiche.

7.5. Espressione dei risultati

Per ciascuna delle diluizioni effettuate (da 10^{-1} a 10^{-7}), registrare il numero tra 0 e 3 di tubi positivi (gas + / fluorescenza + / indolo +) e individuare l'NC composto dai 3 numeri corrispondenti al numero dei tubi positivi delle ultime 3 diluizioni che forniscono un numero di tubi positivi >0. Ottenuto l'NC, individuare sull'apposita tabella MPN (Appendice B, Tabella B2) il valore corrispondente e moltiplicarlo per il fattore di diluizione utilizzato. Il risultato ottenuto corrisponde al valore MPN per mL della sospensione primaria preparata ed è espresso come *E. coli* MPN per grammo di campione originale (peso umido).

Per utilità, si riporta un esempio di calcolo.

Diluizione	Gas +/ fluorescenza+/ indolo +						
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Tubo 1	+	+	+	+	-	-	-
Tubo 2	+	+	+	-	+	-	-
Tubo 3	+	+	+	-	-	-	-
Numero caratteristico	3	3	3	1	1	0	0
Indice MPN				7,5			
Fattore di diluizione				10^{-3}			
Risultato				$7,5 \times 10^3$			
MPN <i>E. coli</i> /g peso umido di campione				$7,5 \times 10^3$			

Oltre che per peso umido il risultato può essere espresso anche per peso secco.

Per il calcolo della concentrazione di *E. coli* per peso secco di campione applicare la seguente formula:

$$N_s = N_u \times 100/e$$

dove:

N_s = numero MPN di *E. coli*/g di peso secco;

N_u = numero MPN di *E. coli*/g di peso umido;

e = contenuto percentuale di solidi secchi del campione originale umido.

8. Metodo ISS F 001E rev.00

8.1. Principio del metodo

Tecnica della filtrazione su membrana per E. coli verocitotossigenici (VT E. coli). Con questa tecnica i ceppi di *E. coli* mostrano crescita su terreno cromogeno a (36±1)°C, a seguito di una fase di rivitalizzazione in brodo al triptone di soia modificato, e non producono l'enzima β-glucuronidasi. Le colonie cresciute sono considerate VT *E. coli* presuntivi. I ceppi producono colonie rosa dovute alla loro incapacità di metabolizzare il substrato cromogenico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronide (BCIG), in presenza di cefixima e tellurito quali supplementi selettivi.

Il campione viene inizialmente omogeneizzato e successivamente diluito mediante allestimento di diluizioni decimali. Il campione diluito viene, quindi, filtrato e incubato a (36±1)°C per 6÷18 ore.

Dopo questa prima fase di incubazione, segue incubazione a (36±1)°C per 24 ore su terreno cromogenico. Al termine del periodo di incubazione, si registra il numero delle colonie tipiche cresciute. VT *E. coli* glucuronidasi-negativi formano colonie di colore rosa malva, mentre *E. coli* glucuronidasi-positivi danno origine a colonie di colore blu.

I campioni con elevato contenuto di particolato (maggiore del 20% m/v) tendono a intasare la membrana già alle basse diluizioni o possono mascherare o inibire la crescita degli organismi *target*. Ciò limita il livello al quale *E. coli* può essere rilevato ed enumerato. Inoltre, la crescita numericamente elevata di batteri interferenti sulla membrana può inibire o occultare lo sviluppo di colonie di VT *E. coli*. La combinazione di sali di bile e supplementi anti microbici presenti in alcuni terreni rivitalizzanti può inibire la crescita di *E. coli* danneggiati.

8.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

8.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

8.3.1. Soluzione salina tamponata

Composizione	
Cloruro di sodio	8 g
Cloruro di potassio	0,2 g
Sodio fosfato bibasico	1,15 g
Potassio fosfato monobasico	0,2 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere gli ingredienti in acqua distillata.

Riscaldare agitando frequentemente. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,0 \pm 0,2$.

Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Conservare per non più di un mese in condizioni ottimali.

8.3.2. Brodo al Triptone e Soia modificato

8.3.2.1. Soluzione di Novobiocina

Composizione	
Novobiocina	1 g
Acqua distillata	10 mL

Sciogliere asetticamente 1 g di Novobiocina in 10 mL di acqua distillata e sterilizzare per filtrazione attraverso una membrana con porosità nominale di $0,2 \mu\text{m}$.

Conservare la soluzione a $(2 \div 8)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali. Il supplemento è anche disponibile in commercio in fiale già pronte per l'uso.

8.3.2.2. Terreno completo di Brodo al triptone di soia modificato

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina (triptone)	17 g
Digerito papainico di farina di soia (peptone di soia)	3 g
Glucosio	2,5 g
Cloruro di sodio	5 g
Potassio fosfato monoacido	2,5 g
Acqua distillata	1000 mL

Disciogliere gli ingredienti in agitazione e aggiungere i supplementi in base all'ordine seguente: 1,5 g di Sali di bile n. 3, 1,5 g di Potassio fosfato monoacido.

Se necessario aggiustare il pH a $7,2 \pm 0,2$.

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

Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese. Immediatamente prima dell'uso, aggiungere la soluzione di novobiocina sterile filtrata (8.3.2.1.) in quantità adeguata per raggiungere una concentrazione finale di 40 mg/L.

8.3.3. Chromagar 0:157

Composizione	
Peptone ed estratto di lievito	13 g
Miscela cromogena	1,2 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL

Disciogliere i componenti nell'acqua e scaldare lentamente fino a ebollizione agitando continuamente fino a che siano completamente dissolti. Non autoclavare.

Raffreddare la soluzione a 45°C prima di distribuirla in piastre di Petri. Lasciare solidificare e conservare le piastre al buio a temperatura compresa tra (2÷8)°C per non più di 48 ore.

8.4. Procedura

8.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Pesare un sub campione rappresentativo di 25 grammi (peso umido) in un contenitore da 250 mL. Aggiungere un appropriato volume di brodo al triptone di soia modificato (addizionato, immediatamente prima dell'uso, con novobiocina alla concentrazione finale di 40 µg/mL) (8.3.2.2.) o, alternativamente di soluzione salina tamponata (8.3.1.) per ottenere un peso finale di 250 g. Agitare accuratamente per favorire la miscelazione del campione.

Per l'omogeneizzazione, trattare il campione mediante sonicazione o utilizzando un omogeneizzatore tradizionale che permetta una adeguata sospensione del campione.

Nell'eventualità si utilizzi un omogeneizzatore tradizionale, tipo stomacher, porre il campione miscelato nel sacchetto appropriato ed omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità.

La procedura permette la disgregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

I campioni da analizzare possono contenere quantità variabili di materiale solido; pertanto, alcuni di essi potranno richiedere una fase di centrifugazione e di prefiltrazione prima di essere analizzati per filtrazione. In questo caso, trasferire il contenuto del recipiente in un sacchetto sterile per omogeneizzatore, con o senza filtro integrato per escludere le particelle più grandi, e omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità. Trasferire il contenuto del sacchetto nelle idonee provette da centrifuga e centrifugare per 3 minuti, impostando una velocità di 200÷300 g/minuto.

Decantare in un beaker il supernatante e filtrare attraverso un pre-filtro in fibra di vetro di diametro di 47 mm a porosità nominale di 2,7 µm per rimuovere i detriti più fini. Per evitare intasamenti, versare il campione nell'imbuto da filtrazione lentamente. Una volta terminata la prefiltrazione, trasferire il filtrato in un contenitore sterile da 250 mL.

Per campioni trattati con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ agitando il campione per assicurarne la completa omogeneizzazione. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione.

Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

8.4.2. Preparazione delle diluizioni dalla sospensione primaria

I volumi e le diluizioni dei campioni dovrebbero essere scelti in modo tale che il numero degli organismi target previsti nel campione esprima sulla membrana filtrante un numero di colonie possibilmente compreso tra 20÷80. Solitamente la sospensione primaria dovrebbe essere diluita serialmente da 10 a 1000 volte (10-1÷10-3) con brodo al triptone di soia modificato e

addizionato. Campioni previsti con carichi maggiori, richiederanno ulteriori diluizioni della sospensione primaria. Una quantità adeguata di contenitori sterili dovrà essere, pertanto, preparata in relazione al numero di diluizioni da effettuare.

Sterilmente a 10 mL della sospensione primaria aggiungere 90 mL di brodo al triptone di soia modificato (8.3.2.). Miscelare accuratamente.

Dalla prima diluizione sterilmente trasferire 10 mL in 90 mL di brodo e rimescolare. Continuare fino alla preparazione di tutte le diluizioni necessarie.

8.4.3. Filtrazione su membrana

Prima della fase di filtrazione inserire, in tante capsule di Petri quante sono le diluizioni, filtri di fibra di vetro saturati con $2\pm 0,5$ mL di brodo al triptone di soia modificato e addizionato con novobiocina (8.3.2.)

Filtrare 10 mL di campione diluito attraverso una membrana quadrettata sterile di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con porosità nominale di $0,45\ \mu\text{m}$. Rimuovere la membrana e trasferirla nella capsula contenente il prefiltra imbibito. Ripetere l'operazione per tutte le diluizioni preparate.

Poggiare la membrana con un movimento rotatorio per prevenire la formazione di bolle di aria tra il terreno colturale e la membrana stessa. Membrane raggrinzite o strappate devono essere scartate.

8.4.4. Rivitalizzazione e conteggio delle colonie su substrato cromogeno

Dopo filtrazione incubare a $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ per 6÷18 ore. Dal punto di vista pratico, il tempo di incubazione non è pregiudizievole e permette ai campioni di essere trattati comunque entro un normale giorno di lavoro.

Mediante pinzette sterili, rimuovere le membrane dai filtri di fibra di vetro imbevuti di brodo (8.3.2.) e trasferirle sulla superficie di capsule di Petri contenenti il terreno cromogenico (8.3.3.). Incubare a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 24 ore. Dopo incubazione, contare le colonie tipiche rosa come VT *E. coli* presuntivi.

8.4.5. Conferma delle colonie

La conferma di VT *E. coli* può essere condotta con test biochimici e/o test di agglutinazione basati su risposte anticorpali. Tali test sono disponibili in commercio in kit e vanno utilizzati secondo le istruzioni della ditta produttrice.

La conferma diretta di un sierotipo O:157 può essere fatta mediante test di agglutinazione al lattice disponibili commercialmente in kit. In alternativa, una conferma può essere raggiunta mediante l'uso appropriato di tecniche molecolari.

Per l'identificazione degli isolati selezionati ci si può rivolgere a un laboratorio di riferimento per questi patogeni.

8.4.6. Determinazione del peso secco

Il numero di *E. coli* verocitotossigenici può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente con le analisi microbiologiche.

8.5. Espressione dei risultati

Per calcolare la concentrazione di VT *E. coli* in 1 g di campione originale umido o in 1 g di campione secco deve essere utilizzato il numero di VT *E. coli* confermati, ottenuti dalle specifiche diluizioni. Il calcolo prende in considerazione il volume e le diluizioni filtrate e, per il numero di VT *E. coli* per g di campione secco, il contenuto percentuale di sostanza secca.

Calcolare il numero di colonie per g di peso umido in base alla seguente formula:

$$C_u = n/abv$$

dove:

- C_u è la concentrazione di *E. coli* VT espressa come numero per grammo di peso umido;
- n è il numero totale di colonie tipiche di *E. coli* VT contate nelle diluizioni selezionate;
- a è il fattore iniziale di diluizione della sospensione primaria;
- b è il fattore di diluizione delle diluizioni seriali selezionate;
- v è il volume totale filtrato attraverso le membrane delle diluizioni selezionate.

Esempio

Se il volume filtrato delle diluizioni è pari a 10 mL e due delle suddette diluizioni producono conte che rientrano nell'intervallo 10÷100:

Diluizione	Conte
10 ⁻²	81 colonie
10 ⁻³	15 colonie

Si ottiene:

- n = numero di colonie (81+15 = 96)
- a = fattore iniziale di diluizione (10⁻¹)
- b = fattore di diluizione delle diluizioni selezionate (10⁻² e 10⁻³)
- v = volume filtrato (10 mL)
- $C_u = 96/(0,1 \times 0,01 \times 10) + (0,1 \times 0,001 \times 10) = 96/0,0011 = 8,7 \times 10^3$

Il valore ottenuto è la concentrazione di VT *E. coli* per g di peso umido del campione originale (UFC/g di peso umido).

Il numero di colonie per g di peso secco del campione è calcolato, invece, in base alla formula:

$$C_s = (n/abve) \times 100$$

dove:

- e = residuo secco percentuale del campione umido originale (UFC/g di peso secco).

Bibliografia

- De Man JC. MPN tables, corrected. *Eur J Appl Microbiol* 1983;17:301-5
- Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol* 2010;140:360-70.
- Mokady D, Gophna U, Ron EZ. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int J Med Microbiol* 2005; 295:455-62.

- Schmidt H, Karch H. Enterohemolytic phenotypes and genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1996;34:2364-7.
- Trabulsi LR, Keller R, Gomes TAT. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002;8:508-13.
- UNI EN 12880. *Caratterizzazione dei fanghi - Determinazione del residuo secco e dell'umidità*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.
- UNI EN ISO 8199. *Qualità dell'acqua - Linea guida generale per la conta di microrganismi su terreno di coltura*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.
- Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana MD, Gibson G, Hentges E, Sanders ME. Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutr Rev* 2011;69:392-403.

DETERMINAZIONE DI *SALMONELLA* SPP

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Salmonella* spp rilevato con i metodi ISS F(002A rev. 00; 002B rev. 00; 002C rev. 00).

Il genere *Salmonella* comprende microrganismi bastoncellari appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, Gram negativi, aerobi e anaerobi facoltativi, C8-esterasi positivi, non fermentanti lattosio, saccarosio e salicina. La morfologia è simile a quella degli altri enterobatteri; sono motili per la presenza di flagelli peritrichi, eccetto i sierotipi *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* che sono immobili. La maggior parte forma fimbrie; alcuni ceppi del sierotipo *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* producono fimbrie sottili, la cui presenza può renderli inagglutinabili con i sieri anti-O. Ad oggi sono riconosciuti circa 2800 sierotipi di *Salmonella*, differenziabili sulla base dei diversi caratteri antigenici, antigeni somatici (O), capsulari (Vi) e gli antigeni flagellari (H) che fanno parte rispettivamente della fase I e fase II. I diversi sierotipi sono catalogati secondo lo schema di Kauffmann-White dove ognuno viene definito come specie distinta e denominato sulla base della patologia sostenuta o della sorgente, geografica o animale, del primo isolamento.

Per le salmonelle l'organo bersaglio è l'intestino dell'uomo, degli animali domestici e selvatici; talvolta possono essere isolate dal sangue e dagli organi interni dei vertebrati ed essere responsabili di diffuse e ubiquitarie patologie nell'uomo, causate da sierotipi ubiquitari ampiamente diffusi anche negli animali di allevamento (salmonellosi minori).

Le gastroenteriti sono le manifestazioni morbose che si osservano con maggiore frequenza e sono associate all'ingestione di cibi e acqua contaminati. La malattia si manifesta di solito con diarrea ed enterocolite di modesta gravità (tranne nei soggetti anziani, nei defedati, negli immunocompromessi e nei bambini) e, generalmente, tende ad una guarigione spontanea. Numerosi possono comunque essere i portatori asintomatici. Salmonellosi sistemiche (tifo e paratifo), trasmesse direttamente da uomo a uomo attraverso il circuito fecale-orale, sono invece causate esclusivamente da sierotipi adattati all'uomo (*S. Typhi*, e *S. Paratyphi A*, *S. Schottmuelleri* e *S. Hirschfeldii*). In genere sono di modesta gravità ma, in assenza di una adeguata terapia, possono occasionalmente essere anche mortali.

La dose infettante è in funzione del sierotipo e delle condizioni dell'ospite e in genere varia da 10^7 a 10^9 . Il periodo di incubazione dell'infezione è variabile e di norma è di 1-8 giorni con una durata di 2-10 giorni.

L'acidità gastrica è un importante meccanismo di difesa. Tuttavia, alcune specie possono sopravvivere e penetrare nell'epitelio intestinale, anche se solo *S. Typhi* è sistematicamente invasiva.

Le salmonelle si trovano frequentemente nei liquami, nei fanghi di risulta, nei sedimenti, in acque costiere, lacustri e nel suolo dove si moltiplicano però in maniera non significativa.

La presenza di salmonelle nell'ambiente è indice di una contaminazione fecale primaria, per immissione diretta di scarichi fognari, o secondaria, ad esempio dovuta a dilavamento di suoli contaminati. La presenza di salmonelle inglobate nei fanghi di risulta può rappresentare un rischio sanitario e una limitazione per la pratica di recupero di tale matrice organica. Un rischio di contrarre l'infezione è anche legato alla possibilità di contaminazione di colture vegetali, attraverso la catena alimentare.

In condizioni ambientali favorevoli, le salmonelle possono sopravvivere per settimane in ambiente idrico e per mesi nei suoli. Nelle matrici solide, infatti, la disponibilità di nutrienti è molto più elevata rispetto a una soluzione acquosa e i microrganismi adesi al particolato catabolizzano direttamente i composti di cui il microgranulo è costituito; l'attività metabolica è

pertanto più intensa e il numero di cellule più elevato. Il particolato svolge anche una funzione protettiva nei confronti dei microrganismi qualora esposti all'effetto di fattori abiotici e biotici (presenza di disinfettanti, radiazioni ultraviolette, metalli pesanti, infezione da parte di batteriofagi). In questo caso, ad una maggiore capacità di sopravvivenza, 85 volte più alta rispetto a quella di microrganismi sospesi in acqua, può corrispondere un aumento delle concentrazioni microbiche anche di 100÷1000 volte.

La capacità di sopravvivenza di *Salmonella* in suoli trattati con fanghi dipende in modo prevalente da fattori climatici anche se, in funzione dei diversi sierotipi, i tempi di sopravvivenza possono ampiamente variare (da 1 mese a un anno). Le salmonelle sono, generalmente, in numero ridotto rispetto agli indicatori di contaminazione fecale e variabili in funzione delle patologie diffuse all'interno della popolazione.

Diversi studi hanno messo in evidenza che la diffusione di *Salmonella* nell'ambiente può essere favorita dall'uso, come fertilizzanti, di fanghi non trattati; indagini svolte dove questa pratica è comunemente applicata hanno evidenziato che nel fango non igienizzato è possibile rilevare concentrazioni variabili tra 2 e 5 milioni di salmonelle per litro con percentuali molto elevate di campioni positivi (97%). I processi di trattamento del fango sono comunque in grado di ridurre il numero di salmonelle, come di tutti i microrganismi presenti, anche se i diversi trattamenti possono produrre differenti risultati. Infatti, se la digestione anaerobica mesofila permette di ridurre di due unità logaritmiche il numero di cellule di *Salmonella*, mediante la digestione aerobica mesofila si raggiunge un abbattimento di tre unità logaritmiche della sua concentrazione, mentre la digestione aerobica a freddo consente un abbattimento di un solo fattore logaritmico.

La ricerca di *Salmonella* nei fanghi di depurazione, come anche in matrici simili, può fornire risultati diversi quando gli stessi campioni vengono analizzati con metodiche diverse. Possono essere, pertanto, calcolate differenze significative nelle medie dei valori ottenuti qualora, prima dell'esame microbiologico, sul campione viene o meno praticato un dato pretrattamento finalizzato alla disgregazione delle particelle con conseguente separazione e rilascio dei microrganismi in esse aggregati consentendone, quindi, un maggiore recupero.

In campo analitico la stima della concentrazione microbica presente in matrici come fanghi, suoli, sedimenti e ammendanti organici risulta molto complessa e laboriosa proprio per le capacità di adesione dei microrganismi al substrato.

Di seguito vengono presentati tre metodi analitici che permettono di determinare *Salmonella* spp in matrici ambientali solide, quali fanghi di depurazione trattati e non trattati, o in matrici ad essi assimilabili, quali ammendanti organici e rifiuti organici, compost, suoli anche concimati e sedimenti:

- Metodo ISS F 002A rev.00
con tecnica della filtrazione su membrana utilizzando un terreno cromogenico.
- Metodo ISS F 002B rev.00
con tecnica della conta del valore dell'MPN.
- Metodo ISS F 002C rev.00
con tecnica della Presenza/Assenza.

1. Campo di applicazione

Le procedure di analisi descritte possono essere utilizzate per il rilevamento di *Salmonella* spp in campioni di fanghi di depurazione, altri fanghi trattati e non trattati, ammendanti organici e rifiuti organici, compost, suoli anche concimati, sedimenti e sabbie.

I metodi descritti sono anche adatti per valutare l'efficienza delle procedure di trattamento volte all'abbattimento di patogeni nei fanghi di depurazione.

2. Termini e definizioni

In relazione al metodo descritto, si applicano i seguenti termini e definizioni:

- *Salmonella* spp: genere di microrganismi bastoncellari appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, Gram negativi, aerobi e anaerobi facoltativi, C8-esterasi positivi, non fermentanti il lattosio, saccarosio e salicina, generalmente motili per la presenza di flagelli peritrichi e differenziabili sulla base dei diversi caratteri antigenici: antigeni somatici (O), capsulari (Vi) e antigeni flagellari (H).
- Batteri danneggiati sub-letalmente: cellule batteriche stressate, ma non uccise, dal processo di conservazione o dai trattamenti successivi, come per esempio dopo un processo di digestione mesofila anaerobica, di stabilizzazione a calce o di compostaggio e che, quindi, non possono essere recuperati.
- Rivitalizzazione: Consiste nella stimolazione della crescita vegetativa di batteri danneggiati e per questo non in grado di crescere direttamente su terreno agarizzato.
- Rivitalizzazione quantitativa: Consiste nella stimolazione della crescita vegetativa di batteri danneggiati isolati su una membrana filtrante, prima del trasferimento su altro terreno.
- Unità Formanti Colonia (UFC): È un valore che rappresenta il numero di colonie visibili formate da singole cellule batteriche cresciute su piastre agarizzate.
- Sospensione primaria: È la prima diluizione effettuata sul campione.
- Numero più probabile (*Most Probable Number*, MPN): ogni tubo o pozzetto il cui inoculo contenga anche un solo organismo vitale che produrrà crescita rilevabile e/o una variazione del terreno colturale.
- Residuo secco: La porzione di massa secca del materiale sotto esame ottenuta dopo uno specifico processo di essiccazione. Viene espresso come percentuale oppure in grammi di sostanza secca per chilo.

3. Campionamento e conservazione del campione

Durante il campionamento operare attenendosi alle usuali regole di sicurezza e utilizzare preferibilmente dispositivi di protezione individuale. Prelevare campioni mai inferiori a 100 g di peso umido e trasferirli in laboratorio entro le 24 ore successive al prelievo.

Durante il trasporto e lo stoccaggio, per evitare fenomeni di moltiplicazione o inattivazione cellulare, mantenere refrigerati i campioni a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per un massimo di 36 ore.

Tenere i campioni lontano da alimenti e bevande e protetti da eventuali rotture del contenitore.

4. Metodo ISS F 002A rev.00

4.1. Principio del metodo

Tecnica della filtrazione su membrana. *Salmonella* spp è in grado di svilupparsi in brodo di rivitalizzazione al tetrionato alla temperatura di $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ e di crescere su Rambach agar a $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$, grazie alla fermentazione del glicole polipropilenico e alla produzione di acidità.

Il campione, diluito in funzione della concentrazione di *Salmonella* in esso stimata, è omogeneizzato, centrifugato e filtrato; la membrana è recuperata asepticamente e incubata a $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ posta su un filtro sterile a fibre di vetro imbibito con il terreno brodo al Tetrionato. Dopo 24 ore la membrana è recuperata asepticamente e incubata a $(36\pm 2)^{\circ}\text{C}$ su terreno cromogeno (Rambach® agar). Le membrane sono esaminate dopo 24 e 48 ore per rilevare anche specie più esigenti (quale *S. Dublin*); dopo incubazione si procede a quantificare le colonie. Le salmonelle presuntive crescono su questo terreno come colonie di un colore rosso brillante, derivante dalla fermentazione del glicole propilenico. Tuttavia, alcuni ceppi di *Salmonella* non fermentanti il glicole propilenico crescono come colonie incolori (*S. Typhi* e *S. Paratyphi*). Altre enterobatteriacee appaiono blu, verdi, viola o incolori per la loro incapacità di fermentare il glicole propilenico. Alcune salmonelle producono β -galattosidasi che idrolizza il 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattopiranoside incolore (X-gal), presente nel terreno, producendo colonie blu. Per distinguere *Salmonella* spp dall'occasionale presenza di *Citrobacter* spp, nebulizzare una soluzione di 4-metilumbelliferil caprilato in etanolo (1 mg/mL) direttamente sulla membrana posta su Rambach agar. La presenza di *Salmonella* spp è segnalata dalla fluorescenza emessa dalle colonie esposte a luce ultravioletta a 366 nm di lunghezza d'onda, derivante dalla reazione di idrolisi del 4-metilumbelliferil caprilato operata dall'enzima C8-esterasi, presente in *Salmonella* spp.

4.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

4.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

4.3.1. Soluzione salina tamponata

Composizione	
Cloruro di sodio	8 g
Cloruro di potassio	0,2 g
Sodio fosfato bibasico	1,15 g
Potassio fosfato monobasico	0,2 g
Acqua distillata	1000 mL

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

Sospendere gli ingredienti in acqua distillata.

Riscaldare agitando frequentemente. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,0\pm 0,2$.

Sterilizzare in autoclave a $(121\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

Conservare per non più di un mese in condizioni ottimali.

4.3.2. Brodo al Triptone e Soia modificato (MTSB)

4.3.2.1. Soluzione di Novobiocina

Composizione	
Novobiocina	1 g
Acqua distillata	10 mL

Asetticamente, sciogliere 1 g di Novobiocina in 10 mL di acqua distillata e sterilizzare per filtrazione su una membrana con porosità nominale di 0,2 µm.

Conservare la soluzione a (2÷8)°C per non più di un mese in condizioni ottimali. Il supplemento è anche disponibile in commercio in fiale già pronte per l'uso.

4.3.2.2. Terreno completo di Brodo al triptone e soia modificato

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina (triptone)	17 g
Digerito papainico di farina di soia (peptone di soia)	3 g
Glucosio	2,5 g
Cloruro di sodio	5 g
Potassio fosfato monoacido	2,5 g
Acqua distillata	1000 mL

Disciogliere gli ingredienti in agitazione.

Aggiungere i supplementi nel seguente ordine: 1,5 g di Sali di bile n. 3, 1,5 g di Potassio fosfato monoacido.

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Se necessario aggiustare il pH a 7,2±0,2.

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

Conservare a (5±3)°C per non più di un mese. Immediatamente prima dell'uso, aggiungere la soluzione di novobiocina sterile filtrata (3.3.2.1.) per raggiungere una concentrazione finale di 40 mg/L.

4.3.3. Terreno di rivitalizzazione Brodo al tetrionato

Composizione	
Lab-Lemco (estratto di carne)	0,9 g
Peptone	4,5 g
Estratto di lievito	1,8 g
Cloruro di sodio	4,5 g
Carbonato di calcio	25 g
Sodio tiosolfato pentaidrato	40,7 g
Acqua distillata	1000 mL

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

Sciogliere gli ingredienti in acqua distillata sotto agitazione e aggiustare il pH a 8,0±0,2; portare lentamente ad ebollizione, quindi lasciare raffreddare a (45±2)°C.

Conservare a (5±3)°C per non più di un mese.

Prima dell'uso aggiungere 20 mL di una soluzione di iodio-ioduro (4.3.3.1.).

4.3.3.1. Soluzione iodio-ioduro

Composizione	
Iodio	6 g
Potassio ioduro	5 g
Acqua distillata	20 mL

Immediatamente prima dell'uso aggiungere soluzione di novobiocina (4.3.2.1.), preparata fresca e sterilizzata per filtrazione, in quantità tale da ottenere una concentrazione finale di 40 mg/L.

4.3.4. Terreno cromogeno Rambach® agar

Composizione	
Peptone	8 g
Cloruro di sodio	5 g
Desossicolato di sodio	1 g
Miscela cromogena	1,5 g
Glicol propilenico	10,5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova in commercio e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. In funzione della quantità di terreno da preparare, aggiungere un volume di acqua distillata alla miscela cromogena già pronta nella confezione. Agitare fino alla completa dissoluzione dei componenti. Aggiungere la fiala del terreno disidratato e riscaldare agitando frequentemente. Il tempo di solubilizzazione di una sospensione di 250 mL è di 20÷25 minuti; per la solubilizzazione di 1000 mL di terreno sono necessari 35÷40 minuti. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,3 \pm 0,2$. Non sterilizzare, non surriscaldare. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare ad una temperatura non inferiore a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

Il substrato è classificato come tossico nocivo (Xn) e irritante (Xi) per la presenza di sodio desossicolato e Tris(idrossimetil-amminometano). Se inalato, può causare irritazioni alla pelle e problemi respiratori. Lavorare sotto cappa durante la manipolazione del terreno. Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

4.3.5. Soluzione di 4-metilumbelliferil caprilato (C₈ esterasi)

Composizione	
4-metilumbelliferil caprilato	1 %
Eptano	99 %

Prodotto brevettato, disponibile in commercio, da usare e conservare secondo le istruzioni della ditta produttrice.

Il prodotto è classificato come infiammabile (F) e irritante (Xi) per la presenza di eptano.

Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego e utilizzare dispositivi di protezione individuali.

4.3.6. Soluzione salina peptonata

Composizione	
Peptone	1 g
Cloruro di sodio	8,5 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere gli ingredienti in acqua distillata. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,0 \pm 0,2$. Riscaldare agitando frequentemente. Sterilizzare la soluzione in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di 3 mesi in condizioni ottimali.

4.4. Procedura

4.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Pesare un sub-campione rappresentativo di 25 g (peso umido) in un contenitore da 250 mL. Aggiungere un appropriato volume di Soluzione salina tamponata (4.3.1.) a pH 7,0 per ottenere un volume finale di 250 mL.

Per l'omogeneizzazione del campione utilizzare preferibilmente un sonicatore o comunque un omogeneizzatore tradizionale che ne permetta una adeguata sospensione. La procedura permette la disaggregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

I campioni da analizzare possono contenere quantità variabili di materiale solido; pertanto, alcuni di essi potranno richiedere una fase di centrifugazione e di prefiltrazione prima di essere analizzati per filtrazione. In questo caso, trasferire il contenuto del recipiente in un sacchetto sterile per omogeneizzatore, con o senza filtro integrato per escludere le particelle più grandi, e omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità. Trasferire il contenuto del sacchetto in 5 tubi conici sterili da centrifuga e centrifugare le 5 aliquote da 50 mL per 3 minuti a una velocità di $200 \div 300$ g/minuto.

Decantare il supernatante in un becker e filtrare attraverso un pre-filtro in fibra di vetro di diametro di 47 mm e porosità nominale di $2,7 \mu\text{m}$ per rimuovere i detriti più fini. Per evitare intasamenti versare il campione nell'imbuto da filtrazione poco alla volta. Terminata la prefiltrazione, trasferire il filtrato (sospensione primaria) in un contenitore sterile da 250 mL.

Per matrici trattate con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ agitando il campione per assicurare un'omogeneizzazione completa. Se durante la neutralizzazione il pH scende sotto il valore 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

4.4.2. Preparazione delle diluizioni dalla sospensione primaria

Il numero delle diluizioni del campione da filtrare successivamente varia in funzione della concentrazione stimata di *Salmonella* presente nel campione. Solitamente, la sospensione primaria (il filtrato) dovrebbe essere diluita in modo decimale da 10^{-1} a 10^{-3} con MTSB (4.3.2.2.). Livelli di contaminazione di *Salmonella* più alti richiederanno ulteriori diluizioni (fino a 10^{-4} - 10^{-5}).

Preparare un numero adatto di contenitori sterili a seconda del numero di diluizioni selezionate e asepticamente dispensare 90 mL di MTSB in ciascun contenitore.

Usando una pipetta sterile, trasferire 10 mL della sospensione primaria nei 90 mL di MTSB, quindi mescolare bene utilizzando un agitatore.

Procedere come sopra descritto per preparare tutte le diluizioni necessarie.

4.4.3. Filtrazione per membrana

Prima della fase di filtrazione, inserire filtri di fibra di vetro saturati con il brodo al Tetrionato (4.3.3.) ($2\pm 0,5$ mL) in tante capsule di Petri quante sono le diluizioni.

Aggiungere una quantità sufficiente di Soluzione salina tamponata (4.3.1.) (15 o 20 mL) nell'apparato di filtrazione; pipettare 10 mL del campione diluito nell'apparato di filtrazione.

Filtrare il campione attraverso una membrana quadrettata sterile di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con porosità nominale di $0,45\ \mu\text{m}$.

Rimuovere la membrana e trasferirla nella capsula contenente il prefiltra imbibito.

Ripetere l'operazione per tutte le diluizioni preparate. Come di norma, poggiare la membrana con un movimento rotatorio per prevenire la formazione di bolle di aria tra il terreno culturale e la membrana. Membrane raggrinzite o strappate devono essere scartate.

Prima di filtrare la prima diluizione, filtrare 10 mL di MTSB (4.3.2.2.) come controllo negativo.

Dopo l'ultima diluizione, filtrare un secondo controllo negativo (10 mL di MTSB) e un controllo positivo (costituito, ad esempio, da una sospensione di *Salmonella* spp di un ceppo certificato contenente microrganismi in concentrazione 10^2 UFC/mL).

4.4.4. Rivitalizzazione e conteggio delle colonie su substrato cromogeno

Incubare a $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore. Mediante pinzette sterili rimuovere le membrane dai filtri di fibra di vetro imbevuti di Brodo al Tetrionato e trasferirle sulla superficie di capsule di Petri contenenti Rambach agar (4.3.4.). Incubare a $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ per 24 e 48 ore. Contare le colonie tipiche rosa come presuntive. *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Senftenberg* possono essere rilevate già dopo 24 ore; tuttavia, per il rilevamento di ceppi più esigenti, come *S. Dublin*, possono essere necessarie 48 ore.

4.4.5. Conferma delle colonie

Le colonie tipiche presuntive devono essere confermate entro le 48 ore. Pertanto, dopo aver aerosolizzato una soluzione di C_8 -esterasi (4.3.5.) sulle capsule di Petri contenenti Rambach agar (4.3.4.), contare le colonie sotto la luce ultravioletta a 366 nm. Prima di procedere al conteggio, far evaporare l'eccesso di C_8 -esterasi. Il rilevamento di colonie fluorescenti conferma la presenza di *Salmonella* spp. Per il calcolo dei risultati sarebbe opportuno tenere in considerazione la norma UNI EN ISO 8199. Ove necessario, procedere con i test di siero tipizzazione consultando i test specifici.

4.4.6. Determinazione del peso secco

Il numero di salmonelle può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente con le analisi microbiologiche.

4.5. Espressione dei risultati

Il numero di salmonelle (presente in 1 grammo di peso umido del campione originale) viene calcolato moltiplicando il numero delle colonie tipiche e fluorescenti per il fattore di diluizione complessivo.

Per il calcolo considerare le semine che rientrano in un numero compreso nell'intervallo tra 10 e 100 colonie tipiche, dopo conferma sul substrato Rambach agar. Se non ci sono conteggi in questo intervallo può essere opportuno considerare conte al di fuori di esso, a condizione che sia possibile una enumerazione accurata.

Calcolare il numero di colonie per g di peso umido in base alla formula:

$$C_u = n/abv$$

dove:

C_u è la concentrazione di *Salmonella* spp per peso umido espressa come numero per grammo;

n è il numero totale di colonie tipiche di *Salmonella* spp nelle diluizioni selezionate;

a è il fattore iniziale di diluizione;

b è il fattore di diluizione per le diluizioni seriali;

v è il volume totale filtrato attraverso le membrane delle diluizioni selezionate.

Esempio

Se il volume filtrato delle diluizioni è pari a 10 mL e due delle suddette diluizioni producono conte che rientrano nell'intervallo 10÷100:

Diluizione	Conte
10 ⁻²	81 colonie
10 ⁻³	15 colonie

Si ottiene:

n = numero di colonie (81+15 = 96)

a = fattore iniziale di diluizione (10⁻¹)

b = fattore di diluizione delle diluizioni selezionate (10⁻² e 10⁻³)

v = volume filtrato (10 mL)

$C_u = 96/(0,1 \times 0,01 \times 10) + (0,1 \times 0,001 \times 10) = 96/0,0011 = 8,7 \times 10^3$

Il valore ottenuto è la concentrazione di *Salmonella* spp per g di peso umido del campione originale (UFC/g di peso umido).

Il numero di colonie per g di peso secco del campione è calcolato, invece, in base alla formula:

$$C_s = (n/abve) \times 100$$

dove:

e = residuo secco percentuale del campione umido originale (UFC/g di peso secco).

5. Metodo ISS F 002B rev.00

5.1. Principio del metodo

Tecnica della conta del valore dell'MPN. *Salmonella* spp è in grado di riprodursi nel brodo alla selenite-cistina a (36±1)°C, nel brodo di arricchimento-selettivo di Rappaport Vassiliadis (42±1)°C e di produrre colonie su Rambach agar oppure su Xilosio Lisina Desossicolato (XLD) agar a (36±1)°C. Con questa procedura, alcune specie di *Salmonella* come *S. Typhi* e *S. Paratyphi* non sono tuttavia rilevabili.

Utilizzare sei serie di tre beute o di tubi contenenti diluizioni sequenziali della sospensione del campione.

Il rilevamento di *Salmonella* spp prevede quattro fasi:

- a) crescita dei batteri in un terreno selettivo primario;
- b) arricchimento in un terreno selettivo secondario che inibisce la crescita degli altri microrganismi favorendo quella di *Salmonella* spp;
- c) isolamento su terreni solidi specifici e selettivi;
- d) eventualmente, test di identificazione biochimici e sierologici.

5.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

5.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

5.3.1. Soluzione salina peptonata

Composizione	
Peptone	1 g
Cloruro di sodio	8,5 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere gli ingredienti in acqua distillata. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,0 \pm 0,2$. Riscaldare agitando frequentemente. Sterilizzare la soluzione in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di 3 mesi in condizioni ottimali.

5.3.2. Brodo alla selenite e cistina

Composizione	
Peptone di caseina	5 g
Lattosio	4 g
Sodio fosfato bibasico	10 g
Sodio selenito acido	4 g
L-cistina	0,01 g
Acqua distillata	900 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata. Si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere aseptivamente i componenti in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente e distribuire in beute sterili da 125 mL in ragione di 90 mL/beuta e in tubi da 25 mL in ragione di 9 mL/tubo. Aggiustare il pH finale a $7,0 \pm 0,2$. Non surriscaldare e non autoclavare. Poiché la selenite è altamente tossica, leggere con cura la scheda di sicurezza e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

5.3.3. Brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis

Composizione	
Peptone di soia	4,5 g
Cloruro di magnesio esaidrato	28,6 g
Cloruro di sodio	7,2 g
Potassio fosfato bibasico	0,18 g
Potassio fosfato monobasico	1,26 g
Verde malachite ossalato	0,036 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere i componenti in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Se necessario aggiustare il pH a $5,2 \pm 0,1$. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo) e sterilizzare in autoclave a $(115 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti.

5.3.4. Xilosio-Lisina-Desossicolato agar (XLD)

5.3.4.1. Soluzione al rosso fenolo

Composizione	
Rosso fenolo	1 g
Idrossido di sodio soluzione (0,1 mol/L)	1,25 mL
Acqua distillata	250 mL

Sospendere 1 g di rosso fenolo in 1,25 mL di soluzione di idrossido di sodio e portare la soluzione a volume di 250 mL con acqua distillata.

5.3.4.2. Terreno completo XLD agar

Composizione	
Estratto di lievito	3 g
Cloruro di sodio	5 g
L-lisina cloridrato	5 g
Agar	12,5 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno completo si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere i componenti e riscaldare la miscela fino a completa soluzione. Sterilizzare in autoclave per 15 minuti a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$, e aggiungere i supplementi nelle concentrazioni sotto indicate:

Lattosio	7,5 g
Saccarosio	7,5 g
Xilosio	3,75 g
Sodio desossicolato	1 g
Sodio tiosolfato	6,8 g
Ferro ammonio citrato	0,8 g
Soluzione di rosso fenolo	20 mL

Aggiungere asepticamente i supplementi alla miscela sterile ed aggiustare il pH a $7,4 \pm 0,2$. Riscaldare a bagnomaria per 45 ± 1 minuti e versare in capsule di Petri. Lasciare solidificare.

5.3.5. Terreno cromogeno Rambach® agar

Composizione	
Peptone	8 g
Cloruro di sodio	5 g
Desossicolato di sodio	1 g
Miscela cromogena	1,5 g
Glicol propilenico	10,5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova in commercio e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. In funzione della quantità di terreno da preparare, aggiungere un volume di acqua distillata alla miscela cromogena già pronta nella confezione. Agitare fino alla completa dissoluzione dei componenti.

Aggiungere la fiala del terreno disidratato e riscaldare agitando frequentemente. Il tempo di solubilizzazione di una sospensione di 250 mL è di 20÷25 minuti; per la solubilizzazione di 1000 mL di terreno sono necessari 35÷40 minuti. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,3\pm 0,2$. Non sterilizzare, non surriscaldare.

Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare.

Conservare ad una temperatura non inferiore a $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

Il substrato è classificato come tossico nocivo (Xn) e irritante (Xi) per la presenza di sodio desossicolato e Tris(idrossimetil-amminometano). Se inalato, può causare irritazioni alla pelle e problemi respiratori. Lavorare sotto cappa durante la manipolazione del terreno.

Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

5.3.6. Terreno all'urea

5.3.6.1. Terreno all'urea base

Composizione	
Triptone	1 g
Glucosio	1 g
Cloruro di sodio	5 g
Potassio fosfato monobasico	2 g
Rosso fenolo	0,012 g
Agar	12 g
Acqua distillata	950 mL

Sciogliere gli ingredienti in agitazione riscaldando la soluzione. Aggiustare il valore di pH dopo sterilizzazione a $\text{pH } 6,8\pm 0,1$. Sterilizzare in autoclave a $(121\pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

5.3.6.2. Soluzione di urea

Composizione	
Urea	400 g
Acqua distillata	1000 mL

Sospendere l'urea in acqua distillata portando a un volume di 1000 mL. Sterilizzare la soluzione per filtrazione attraverso un filtro sterile con porosità di $0,2 \mu\text{m}$.

5.3.6.3. Terreno all'urea completo

Il terreno si trova anche in commercio e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sciogliere il terreno di base all'urea (5.3.6.1.), raffreddarlo alla temperatura di $(45\pm 1)^\circ\text{C}$ e a 950 mL aggiungere asepticamente 50 mL della soluzione di urea. Distribuire in tubi sterili in ragione di circa 10 mL/tubo, lasciare solidificare su un piano inclinato per ottenere una superficie a becco di clarino.

5.3.7. Brodo al triptofano-triptone per la prova della produzione di Indolo

Composizione	
Triptone	10 g
DL-triptofano	1 g
Cloruro di sodio	5 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere i componenti in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Aggiustare il valore di pH dopo sterilizzazione a pH di $7,4\pm 0,1$. Distribuire in tubi in ragione di 5 mL/tubo e sterilizzare in autoclave a $(121\pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

5.3.8. Reattivo di Kovacs

Composizione	
Para-dimetilamminobenzaldeide	5 g
Alcool amilico	75 mL
Acido cloridrico (0,1 M)	25 mL

Il reattivo si trova anche in commercio già pronto per l'uso. In alternativa, sciogliere il para-dimetilamminobenzaldeide in 75 mL di alcool amilico e riscaldare a bagnomaria a circa 60°C per circa 5 minuti. Aggiungere 25 mL di acido cloridrico (0,1 M). Il reattivo sarà pronto per l'uso dopo circa 6÷7 ore (colorazione gialla). Mantenere a $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ e proteggere dalla luce.

Il reattivo è un prodotto nocivo, deve essere preparato utilizzando la cappa chimica. Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

5.3.9. Terreno per la prova della lisina decarbossilasi**5.3.9.1. Soluzione di porpora di bromocresolo**

Composizione	
Porpora di bromocresolo	1 g
Acqua distillata	100 mL

Sospendere il porpora di bromocresolo in acqua distillata.

5.3.9.2. Terreno completo per la prova della lisina decarbossilasi

Composizione	
L-lisina	5 g
Estratto di lievito	3 g
Glucosio	1 g
Soluzione di porpora di bromocresolo	1,5 mL
Acqua distillata	1000 mL

Sospendere i componenti in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente a bagnomaria. Distribuire in tubi in ragione di 5 mL/tubo e sterilizzare in autoclave a $(121\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Eventualmente aggiustare il valore di pH usando una soluzione di idrossido di sodio (0,1 M) per ottenere, dopo sterilizzazione, un pH $6,8\pm 0,1$.

5.3.10. Triptone soia agar

Composizione	
Triptone	15 g
Peptone di soia	5 g
Cloruro di sodio	5 g
Agar	20 g
Acqua distillata	1000 mL

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

Sospendere i componenti in acqua distillata. Riscaldare fino a completa soluzione agitando frequentemente. Se necessario aggiustare il pH a $7,3\pm 0,2$. Sterilizzare in autoclave a $(121\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di due settimane in condizioni ottimali.

5.4. Procedura

5.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Sospendere un sub-campione rappresentativo di 25 g (in peso umido) in un appropriato volume di soluzione salina peptonata (5.3.1.) per raggiungere un volume finale di 250 mL. Omogeneizzare utilizzando preferibilmente un sonicatore o un omogeneizzatore tradizionale che permetta una adeguata sospensione del campione. Nell'eventualità si utilizzi un omogeneizzatore tradizionale, tipo stomacher, porre il campione miscelato nel sacchetto appropriato ed omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità. La procedura permette la disaggregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

Per matrici trattate con calce, portare il pH a $7,0\pm 0,5$ agitando il campione per assicurare un'omogeneizzazione completa. Se durante la neutralizzazione il pH scende sotto il valore 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

5.4.2. Preparazione delle diluizioni dalla sospensione primaria

Il numero delle diluizioni da seminare varia in funzione della concentrazione di *Salmonella* spp prevista nel campione. Solitamente, la sospensione primaria dovrebbe essere diluita in modo seriale in soluzione salina peptonata (5.3.1.); una scala di diluizione fino a 10^{-5} dovrebbe comunque essere sufficiente per matrici trattate.

Preparare, pertanto, un quantitativo di provette sterili in base al numero delle diluizioni da effettuare e dispensare in ciascuna di esse 9 mL di soluzione salina peptonata (5.3.1.).

Mediante una pipetta sterile trasferire 1 mL della sospensione primaria nella prima provetta contenente 9 mL di soluzione salina peptonata sterile e miscelare, continuare la preparazione delle diluizioni necessarie procedendo come sopra.

5.4.3. Arricchimento primario

Inoculare 10 mL della sospensione primaria (5.4.1.), in 3 beute contenenti 90 mL di brodo alla selenite e cistina (5.3.2.)

Inoculare 1 mL della sospensione primaria (5.4.1.) in 3 tubi contenenti 9 mL di brodo alla selenite e cistina (5.3.2.).

Da ciascuna diluizione (5.4.2.), (10^{-1} ÷ 10^{-5}), prelevare 1 mL e trasferirlo in ciascuno dei 3 tubi contenenti 9 mL di brodo alla selenite e cistina. Incubare le 3 beute e i 18 tubi a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 21 ± 3 ore.

5.4.4. Arricchimento selettivo secondario

Dopo incubazione, da ciascuna coltura ottenuta dell'arricchimento primario (5.4.3.), trasferire asepticamente 0,1 mL in tubi contenenti 10 mL di brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis (5.3.3.). Incubare a $(41\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 21 ± 3 ore.

5.4.5. Isolamento

Prelevare dai tubi di Rappaport Vassiliadis (5.3.3), mediante ansa sterile da 10 μL , un'aliquota della coltura e strisciarla sui terreni XLD agar (5.3.4.2) e Rambach agar (5.3.5) al fine di ottenere colonie isolate. Incubare a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 21 ± 3 ore.

5.4.6. Identificazione di colture pure

Identificare le colonie tipiche e presuntive di *Salmonella* spp sui terreni XLD agar e Rambach agar. Su XLD agar le colonie tipiche esibiscono un colore rosso rosato con centro nero ad eccezione dei ceppi H_2S negativi (es. *S. Senftenberg*). Tuttavia le salmonelle possono presentarsi anche di colore nero. Sul terreno Rambach agar si presentano di colore rosa.

Eventualmente, procedere alla conferma sierologica per almeno una colonia tipica identificata su ciascun terreno e per ciascuna diluizione seminata. In alternativa possono essere eseguite conferme biochimiche.

5.4.7. Conferma biochimica

Per accertare l'appartenenza al genere *Salmonella* delle colonie sospette, le prove di conferma biochimica possono essere le seguenti:

- idrolisi dell'urea;
- produzione di indolo;
- decarbossilazione della lisina.

È anche possibile effettuare una identificazione diretta delle colonie sospette, utilizzando i sistemi miniaturizzati disponibili in commercio.

Prima di effettuare le prove di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare le colonie sospette su Triptone soia agar (5.3.10.), incubando a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per $18\div 24$ ore. Eseguire le prove su colonie cresciute da non oltre 24 ore.

5.4.7.1. Idrolisi dell'urea

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno Triptone soia agar (5.3.10.), la colonia sospetta e strisciare sulla superficie inclinata del terreno all'urea completo (5.3.6.3.). Incubare a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 21 ± 3 ore e controllare la crescita a brevi intervalli di tempo.

Se la reazione è positiva, la scissione della molecola dell'urea libera ammoniaca, facendo virare il colore del rosso fenolo al rosa e, successivamente, al rosso ciliegia scuro. La reazione spesso è evidente dopo $2\div 4$ ore.

Per *Salmonella* spp, che non idrolizza l'urea e quindi non causa nessun cambiamento di colore, il risultato deve essere negativo.

5.4.7.2. Produzione di indolo

Prelevare con un'ansa sterile le colonie sospette cresciute sul terreno Triptone soia agar (5.3.10.), seguendo le usuali regole di asepsi. Inoculare in tubi contenenti brodo al triptofano-triptone (5.3.7.), ed incubare a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 21 ± 3 ore. Dopo incubazione aggiungere alla brodocoltura alcune gocce del reattivo di Kovacs (5.3.8.), per rilevare la produzione di indolo. Una reazione positiva si manifesta entro pochi secondi con lo sviluppo di una colorazione rossa ad anello sulla superficie del brodo. Per *Salmonella* spp, che non produce indolo, il risultato della prova deve essere negativo.

5.4.7.3. Prova della decarbossilazione della lisina

Prelevare, con un'ansa sterile dal terreno Triptone soia agar (5.3.10.), la colonia sospetta e inoculare immediatamente sotto la superficie del brodo alla lisina (5.3.9.2.). Ricoprire il terreno con paraffina liquida od olio sterile. Incubare a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 21 ± 3 ore.

La positività di *Salmonella* spp è determinata dalla reazione alcalina evidenziata da una colorazione violacea dopo il periodo d'incubazione.

5.4.8. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie sospette mediante identificazione sierologica degli antigeni somatici (O) e flagellari (H). Utilizzando sieri polivalenti, gli stiptiti, selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* spp, possono essere tipizzati in base alla classificazione di Kauffmann-White. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stiptiti isolati come sospetti ai centri di riferimento per la *Salmonella*.

5.4.9. Determinazione del peso secco

Il numero di salmonelle può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente con le analisi microbiologiche.

5.5. Espressione dei risultati

5.5.1. Determinazione del numero più probabile (MPN)

Per ciascuna delle 6 diluizioni (dalla sospensione primaria alla diluizione 10^{-5}), prendere nota del numero delle beute e/o dei tubi che hanno dato risultati positivi su XLD e/o su Rambach agar dopo le fasi di arricchimento e le prove di conferma.

Identificare il Numero Caratteristico (NC) corrispondente considerando che esso corrisponde al numero di tubi positivi delle ultime 3 diluizioni che mostrano un numero di tubi positivi > 0 .

Quando è possibile, scegliere 3 diluizioni seriali per le quali i risultati non sono né totalmente positivi né totalmente negativi. Se ciò non è possibile, è preferibile scegliere le 3 diluizioni seriali con risultati positivi.

Se meno di 3 diluizioni seriali mostrano risultati positivi, usare la diluizione contenente la concentrazione più alta nel campione e le 2 diluizioni successive.

Se ci sono tubi positivi solo per una delle diluizioni seriali seminate, utilizzare questa diluizione con risultato positivo insieme alle diluizioni negative precedente e successiva per ricavare l'NC.

Per utilità, per il calcolo dell'NC, seguire l'esempio presentato.

Diluizione del campione	10^{-1} (sospensione primaria)			10^{-1} (sospensione primaria)			10^{-2}			10^{-3}			10^{-4}			10^{-5}		
	Inoculo (mL)	10	10	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Brodo alla selenite e cistina (mL di brodo di arricchimento)	90	90	90	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Rambach®	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XLD	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NC	3			2			0			0			0			0		

NC: Numero Caratteristico

Conservare le diluizioni del campione a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ fino al risultato finale. Se nelle ultime tre serie di diluizioni (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) i risultati sono tutti positivi, preparare anche diluizioni 10^{-6} e 10^{-7} e trasferire 1 mL per tubo in 3 tubi contenenti ciascuno 9 mL di brodo di selenite-cistina.

5.5.2. Calcolo

Consultare la tabella in Appendice B, Tabella B2 per determinare il valore dell'MPN, per grammo di peso umido.

Esempio

Diluizione del campione	10^{-1}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Volume	10 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Fattore di diluizione	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}

Esempio A

NC	2	1	0	0	0	0
Tabella MPN	1,5					
Fattore di diluizione	100					
Calcolo	$1,5 \times 100$					
Risultato: MPN <i>Salmonella</i> g ⁻¹ di peso umido del campione	1,5					

Esempio B

NC	3	2	1	0	0	0
Tabella MPN	15					
Fattore di diluizione	10^0					
Calcolo	15×10^0					
Risultato: MPN <i>Salmonella</i> g ⁻¹ di peso umido del campione	15					

Esempio C

NC	3	3	2	1	0	0
Tabella MPN	15					
Fattore di diluizione	10^{-1}					
Calcolo	15×10^1					
Risultato: MPN <i>Salmonella</i> g ⁻¹ di peso umido del campione	150					

Esempio D

NC	3	3	2	1	0	0
Tabella MPN	15					
Fattore di diluizione	10^{-2}					
Calcolo	15×10^2					
Risultato: MPN <i>Salmonella</i> g ⁻¹ di peso umido del campione	$1,5 \times 10^3$					

Esempio E

NC	3	3	3	3	2	1
Tabella MPN	15					
Fattore di diluizione	10^{-3}					
Calcolo	15×10^3					
Risultato: MPN <i>Salmonella</i> g ⁻¹ di peso umido del campione	$1,5 \times 10^4$					

I risultati devono essere espressi come *Salmonella* MPN g⁻¹ di peso umido; riportare, preferibilmente, i limiti inferiore e superiore dell'intervallo di confidenza, fra parentesi.

Pertanto, ottenuto il NC individuato sull'apposita tabella (Appendice B, Tabella B2), moltiplicare il valore corrispondente per il fattore di diluizione utilizzato. Il risultato ottenuto corrisponde al valore MPN per mL della sospensione primaria preparata ed è espresso come valore dell'MPN di *Salmonella* spp per grammo di campione originale (peso umido).

Il risultato può essere espresso anche in peso secco mediante la seguente formula:

$$N_s = N_u \times 100/e$$

dove:

N_s = Numero MPN di *Salmonella* /g di peso secco

N_u = Numero MPN di *Salmonella* /g di peso umido.

e = è il contenuto percentuale di solidi secchi del campione originale umido.

6. Metodo ISS F 002C rev.00

6.1. Principio del metodo

Tecnica di Presenza/Assenza. Permette di rilevare salmonelle sulla base della tecnica della Presenza/Assenza che prevede quattro fasi:

- prearricchimento in un terreno selettivo primario;
- arricchimento in un terreno selettivo secondario che inibisce la crescita di microrganismi interferenti favorendo quella di *Salmonella* spp;
- preparazione di colture pure con inoculo su due differenti terreni solidi selettivi;
- identificazione sierologica e/o biochimica.

Il limite di rilevamento per *Salmonella* spp è approssimativamente 10 UFC/50 g di peso umido del campione.

6.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

6.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

6.3.1. Acqua peptonata tamponata addizionata con 40 mg/L di Novobiocina

6.3.1.1. Acqua peptonata tamponata

Composizione	
Peptone da caseina	10 g
Cloruro di sodio	5 g
Potassio diidrogeno fosfato	1,5 g
di-Sodio idrogeno fosfato dodecaidrato	9 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

Sciogliere i componenti mantenendo in agitazione la soluzione. Se necessario aggiustare il pH a $7,0 \pm 0,2$. Dispensare in aliquote da 450 mL e sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

6.3.1.2. Soluzione di Novobiocina

Composizione	
Novobiocina	1 g
Acqua distillata	10 mL

Sciogliere asepticamente 1 g di Novobiocina in 10 mL di acqua distillata e sterilizzare per filtrazione su una membrana con porosità nominale di $0,2 \mu\text{m}$.

Conservare la soluzione a $5 \pm 3^\circ\text{C}$, protetta dalla luce.

La soluzione può essere conservata per una settimana in condizioni ottimali. Il supplemento è anche disponibile in commercio in fiale già pronte per l'uso.

6.3.1.3. Terreno completo: Acqua peptonata tamponata con Novobiocina

Trasferire 180 μL della soluzione di Novobiocina (6.3.1.2.) in aliquote da 450 mL di Acqua peptonata tamponata sterile per ottenere una concentrazione finale di Novobiocina di 40 mg/L. Aggiungere la soluzione di antibiotico immediatamente prima dell'uso e agitare con cura.

6.3.2. Brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis

Composizione	
Peptone di soia	4,5 g
Cloruro di magnesio esaidrato	28,6 g
Cloruro di sodio	7,2 g
Potassio fosfato bibasico	0,18 g
Potassio fosfato monobasico	1,26 g
Verde malachite ossalato	0,036 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere i componenti in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Aggiustare il pH a $5,2 \pm 0,1$. Distribuire in tubi (circa 10 mL/tubo), sterilizzare in autoclave a $(115 \pm 2)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

6.3.3. Xilosio-Lisina-Desossicolato agar (XLD)

6.3.3.1. Soluzione al rosso fenolo

Composizione	
Rosso fenolo	1 g
Idrossido di sodio soluzione (0,1 mol/L)	1,25 mL
Acqua distillata	250 mL

Sospendere 1 g di rosso fenolo in 1,25 mL di soluzione di idrossido di sodio (0,1 M) e portare a volume con acqua distillata fino a 250 mL.

6.3.3.2. Terreno completo XLD agar

Composizione	
Estratto di lievito	3 g
Cloruro di sodio	5 g
L-lisina cloridrato	5 g
Agar	12,5 g
Acqua distillata	1000 mL

Sospendere i componenti e riscaldare la miscela fino a completa soluzione. Sterilizzare in autoclave per 15 minuti a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$, e aggiungere i supplementi nelle concentrazioni sotto indicate:

Lattosio	7,5 g
Saccarosio	7,5 g
Xilosio	3,75 g
Sodio desossicolato	1 g
Sodio tiosolfato	6,8 g
Ferro ammonio citrato	0,8 g
Soluzione di rosso fenolo	20 mL

Aggiungere asepticamente i supplementi alla miscela sterile ed aggiustare il pH a $7,4 \pm 0,2$. Riscaldare a bagnomaria per 45 ± 1 minuti, versare in capsule di Petri e lasciare solidificare. Il terreno completo si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

6.3.4. Verde brillante-rosso fenolo-lattosio-saccarosio agar, modificato (BPLS Agar modificato)

Composizione	
Peptone di carne	5 g
Peptone di caseina	5 g
Estratto di carne	5 g
Cloruro di sodio	3 g
di-Sodio idrogeno fosfato	2 g
Lattosio	10 g
Saccarosio	10 g
Rosso fenolo	0,08 g
Verde brillante	0,0125 g
Agar	12 g
Acqua distillata	1000 mL

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

Sciogliere i componenti in acqua distillata. Riscaldare fino a ebollizione agitando frequentemente. Se necessario aggiustare il pH a $6,9 \pm 0,1$. Non autoclavare. Raffreddare e versare in capsule di Petri.

6.3.5. Agar nutritivo

Composizione	
Estratto di carne	3 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL

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

Sciogliere i componenti in acqua distillata. Portare a ebollizione agitando frequentemente. Se necessario aggiustare il pH a $7,2 \pm 0,2$. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Raffreddare e versare in capsule di Petri.

6.4. Procedura

6.4.1. Arricchimento primario

Pesare un sub-campione rappresentativo di 50 g (peso umido) ed aggiungere 450 mL di Acqua peptonata tamponata contenente novobiocina (6.3.1.3.); incubare a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore in un termostato mantenendo il campione in agitazione (150 rpm). Per aliquote inferiori a 50 g, mantenere il rapporto di 1:10 tra il peso del campione e il volume del terreno di arricchimento primario.

Per matrici trattate con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ agitando il campione per assicurare una completa omogeneizzazione. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

6.4.2. Arricchimento secondario

Trasferire 0,1 mL della coltura di arricchimento primario in due tubi, ciascuno contenente 10 mL di brodo alla soia di Rappaport Vassiliadis (6.3.2); in condizioni statiche incubare un tubo a (36±1)°C e l'altro a (41±1)°C per 21±3 ore.

6.4.3. Isolamento e selezione delle colonie

Prelevando un'ansata (10 µL) da ciascun tubo di arricchimento secondario, strisciare sui terreni di isolamento XLD (6.3.3.2) e BPLS (6.3.4). Incubare a (36±1)°C per 21±3 ore.

Identificare le colonie tipiche e presuntive di *Salmonella* spp cresciute sui terreni XLD agar e BPLS. Sul terreno XLD agar le colonie tipiche esibiscono prevalentemente un colore rosso rosato con centro nero ad eccezione dei ceppi H₂S negativi (es. *Salmonella* Senftenberg H₂S negativi), ma possono presentarsi anche nere. Sul terreno BPLS le colonie tipiche si presentano di colore rosa.

Eeguire subcolture di almeno tre colonie tipiche, ognuna prelevata da ciascun terreno; seminare su agar nutritivo (6.3.5.) e incubare a (36±1)°C per 21±3 ore per ottenere colture pure per la fase di conferma.

6.4.4. Conferma biochimica e sierologica

Qualora si ritenga opportuno, può essere effettuata una conferma biochimica mediante appositi test miniaturizzati disponibili in commercio.

Procedere alla tipizzazione delle colonie sospette di *Salmonella* spp mediante identificazione sierologica degli antigeni somatici e flagellari (O e H). Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* possono essere tipizzati in base alla classifica di Kauffmann-White utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento per *Salmonella*. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

6.4.5. Determinazione del peso secco

Il numero di salmonelle può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente con le analisi microbiologiche.

6.5. Espressione dei risultati

Il risultato positivo per *Salmonella* deve essere espresso come "Presenza di *Salmonella* spp in 50 g di campione"; il risultato negativo per *Salmonella* verrà riportato come "Assenza di *Salmonella* spp in 50 g di campione".

Bibliografia

Breer C. Environmental contamination with Salmonellae by the spread of animal waste and sewage sludge. *Experientia* 1985;41(4):533-7.

De Man JC. MPN tables, corrected. *Eur J Appl Microbiol* 1983;17:301-5.

- Gantzer C, Gaspard P, Galvez L, Huyard A, Dumouthier N, Schwartzbrod J. Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. *Water Res* 2001;35(16):3763-70.
- Mohaibes M, Heinonen-Tanski H. Aerobic thermophilic treatment of farm slurry and food wastes. *Bioresour Technol* 2004;95:245-54.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia medica*. 7^a ed. Assago (MI): Edra Masson; 2011.
- UNI EN 12880. *Caratterizzazione dei fanghi - Determinazione del residuo secco e dell'umidità*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.
- UNI EN ISO 8199. *Qualità dell'acqua - Linea guida generale per la conta di microrganismi su terreno di coltura*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.
- Venglovsky J, Martinez J, Placha I. Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. *Livestock Sci* 2006;102(3):197-203.

DETERMINAZIONE DEGLI ENTEROCOCCHI

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Enterococchi rilevato con i metodi ISS F (003A rev. 00; 003B rev. 00; 003C rev.00).

L'ordinamento tassonomico del gruppo di microrganismi prima compresi sotto l'unica definizione di streptococchi fecali, negli ultimi anni, è stato soggetto ad ampia revisione. Gli studi più recenti hanno distinto, infatti, sulla base di caratteristiche fisiologiche e di tecniche di ibridizzazione del DNA, tre generi diversi di cui due - *Enterococcus* e *Streptococcus* - comprenderebbero specie intestinali o di sicura origine fecale.

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

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

Il genere comprende specie determinate sulla base delle sequenze della subunità 16S dell'rRNA che hanno permesso di individuare la presenza di specie di gruppo. Le specie appartenenti al genere *Enterococcus*, che vengono definite in grado di ridurre il 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro a formazano e di idrolizzare l'esculina a 44°C, soddisfano specifici requisiti: crescita a 10°C e 45°C, resistenza a 60°C per 30 minuti, crescita a pH 9,6 e al 6,5% di NaCl, idrolisi del 4-metilumbelliferil-β-D-glucoside in presenza di tallio acetato, acido nalidixico e 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro. Gruppi diversi sono stati individuati in questo genere e comprendono le specie *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii* (primo gruppo); *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* e *E. malodoratus* (secondo gruppo); *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* (terzo gruppo) *E. faecalis*, *E. cecorum*, *E. colombae* e *E. saccharolyticus*, che hanno tra loro una bassa similarità genotipica, sono stati inseriti in un quarto gruppo. L'appartenenza al genere *Enterococcus* di specie diverse anche dal punto di vista molecolare comporta difficoltà nell'individuare test fenotipici capaci di identificare il genere. Anche il test già comunemente utilizzato per una conferma dell'appartenenza al gruppo, l'idrolisi dell'esculina, se ancora utile ad individuare anche le nuove specie del genere *Enterococcus*, fornisce comunque reazione positiva anche per microrganismi appartenenti ai generi *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* e *Leuconostoc*.

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

La presenza di enterococchi nelle acque reflue e nei fanghi provenienti dagli impianti di trattamento è indice diretto di contaminazione fecale e da tale presenza e relativa concentrazione

dipende il giudizio di qualità di una matrice utilizzata come ammendante e l'interpretazione dell'effetto di sanificazione del dato trattamento a cui è stata sottoposta.

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

Il presente capitolo presenta tre metodi per la determinazione degli enterococchi:

- Metodo ISS F 003A rev.00
con tecnica della filtrazione su membrana.
- Metodo ISS F 003B rev.00
con tecnica della conta del valore dell'MPN su substrato definito a 97 pozzetti.
- Metodo ISS F 003C rev.00
con tecnica della conta del valore dell'MPN su substrato definito a 96 pozzetti.

1. Campo di applicazione

Le procedure di analisi descritte possono essere utilizzate per il rilevamento di enterococchi in campioni di fanghi di depurazione, altri fanghi trattati e non trattati, ammendanti organici e rifiuti organici, compost, suoli anche concimati, sedimenti e sabbie.

Il metodo è particolarmente adatto per valutare l'efficienza delle procedure di trattamento volte all'abbattimento di patogeni nei fanghi di depurazione.

2. Termini e definizioni

In relazione al metodo descritto, si applicano i seguenti termini e definizioni:

- *Enterococchi*: batteri Gram-positivi, catalasi-negativi, cocchi anaerobi facoltativi che crescono in coppie (diplococchi) o in corte catene, e presentano l'antigene del Gruppo D di Lancefield. Gli organismi possono essere differenziati da altri cocchi Gram-positivi catalasi-negativi dalla capacità di crescere in presenza di sali di bile e sodio azide, cloruro di sodio al 6,5%, a 44°C, essere in grado di ridurre il 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) a formazano e produrre piroglutamatoaminopeptidasi (PYR).
- *Forme vegetative*: batteri in grado di crescere normalmente in terreni liquidi o agarizzati che non necessitano di pre-rivitalizzazione.
- *Batteri danneggiati sub-letalmente*: cellule batteriche stressate, ma non uccise, dal processo di conservazione o dai trattamenti successivi, come per esempio dopo un processo di digestione mesofila anaerobica, di stabilizzazione a calce o di compostaggio, e che quindi non possono essere recuperati.
- *Rivitalizzazione*: consiste nella stimolazione della crescita vegetativa di batteri danneggiati non in grado di crescere direttamente su terreno agarizzato.
- *Positivi presuntivi*: sospetti Enterococchi da sottoporre a conferma.
- *Unità Formanti Colonia (UFC)*: è un valore che rappresenta il numero di colonie visibili formate da singole cellule batteriche cresciute su piastre agarizzate.

- *Numero più probabile (Most Probable Number MPN)*: ogni tubo o pozzetto il cui inoculo contenga anche un solo organismo vitale che produrrà crescita rilevabile e/o una variazione nel terreno colturale.
- *Sospensione primaria*: è la prima diluizione effettuata sul campione.
- *Residuo secco*: la porzione di massa secca del materiale sotto esame, ottenuta dopo uno specifico processo di essiccazione. Viene espresso come percentuale oppure in grammi di sostanza secca per chilo.

3. Campionamento e conservazione del campione

Durante il campionamento operare attenendosi alle usuali regole di sicurezza e utilizzare preferibilmente dispositivi di protezione individuale. Prelevare campioni mai inferiori a 100 g di peso umido e trasferirli in laboratorio entro le 24 ore successive al prelievo.

Durante il trasporto e lo stoccaggio, per evitare fenomeni di moltiplicazione o inattivazione cellulare, mantenere refrigerati i campioni a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per un massimo di 36 ore.

Tenere i campioni lontano da alimenti e bevande e protetti da eventuali rotture del contenitore.

4. Metodo ISS F 003A rev.00

4.1. Principio del metodo

Tecnica della filtrazione su membrana. Il campione omogeneizzato diluito viene filtrato, la membrana filtrante viene recuperata asepticamente e incubata su Slanetz e Bartley agar (SBA), per un periodo iniziale di $4\pm 1/2$ ore a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$. Successivamente, la temperatura viene aumentata a $(43\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 16 ± 2 ore. La presenza di Enterococchi presuntivi è indicata dall'esistenza di colonie dal rosa al marrone.

Il substrato agarizzato contiene TTC la cui riduzione a formazano dà luogo a colonie dal rosa a marrone. La conferma viene eseguita su Esculina Azide agar in cui l'idrolisi dell'esculina produce esculetina che combinandosi con il citrato ferrico presente nel substrato produce un precipitato nero/marrone nel terreno.

Questo metodo non è adatto per campioni di fango che sono stati trattati con calce o sottoposti a essiccamento o pastorizzazione, trattamenti che riducono significativamente i livelli batterici a concentrazioni inferiori a 10 cellule vitali di Enterococchi per grammo di peso umido; o per quei campioni dove è prevista una intensa riduzione microbica.

I fanghi con un alto contenuto di solidi ($>20\%$ p/v) tendono a saturare la membrana filtrante alle minime diluizioni o possono mascherare o inibire la crescita degli organismi target limitando, in tal modo, il loro rilevamento.

Il numero massimo di colonie che dovrebbe essere contato su una singola membrana è approssimativamente pari a 100.

Il metodo è adatto a valutare sia la riduzione log di Enterococchi dopo eventuali trattamenti delle diverse matrici, sia la qualità del prodotto originale.

4.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

4.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi, disponibili in commercio, preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

4.3.1. Soluzione di Ringer (1/4 X)

Composizione	
Sodio cloruro	2,25 g
Potassio cloruro	0,11 g
Calcio cloruro esaidrato	0,12 g
Sodio bicarbonato	0,05 g
Acqua distillata	1000 mL

Sono disponibili in commercio compresse a concentrazione idonea. Tuttavia, la soluzione si può preparare a partire dai singoli ingredienti. Aggiungere gli ingredienti ad acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa dissoluzione. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,0 \pm 0,2$.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare la soluzione a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di due settimane.

4.3.2. Slanetz e Bartley agar

Composizione	
Triptosio	20 g
Estratto di lievito	5 g
Destrosio	2 g
Dipotassio idrogeno fosfato	4 g
Sodio azide	0,4 g
Tetrazolio cloruro	0,1 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL

Sospendere gli ingredienti in 1000 mL di acqua distillata e portare a ebollizione agitando continuamente per dissolvere completamente tutti i componenti, non surriscaldare e non autoclavare. Non conservare il terreno e rifonderlo.

Se necessario aggiustare il pH a $7,2 \pm 0,2$. Raffreddare a 50°C circa, distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Il terreno pronto per l'uso deve essere di colore beige con un riflesso rosa pallido se il terreno appare di colore rosa intenso deve essere scartato perché è stato surriscaldato. Conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ al riparo dalla luce per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

4.3.3. Bile Esculina agar

Composizione	
Peptone	8 g
Sali biliari	20 g
Citrato ferrico	0,5 g
Esculina	1 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL

Sospendere gli ingredienti in 1000 mL di acqua distillata e portare a ebollizione agitando continuamente per dissolvere completamente tutti i componenti. Se necessario aggiustare il pH a $7,1 \pm 0,2$. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 min. Raffreddare a 50°C circa, distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare.

Conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non oltre 1 mese.

4.3.4. Soluzione di perossido di idrogeno al 3%

Composizione	
Perossido di idrogeno	3 mL
Acqua distillata	100 mL

Preparare asetticamente e conservare a temperatura ambiente per una settimana.

4.4. Procedura

4.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Miscelare il campione e pesarne prontamente 25 grammi (peso umido) in un contenitore adeguato. Aggiungere soluzione di Ringer (1/4 X) (4.3.1.) in volume appropriato in modo che il peso finale sia pari a 250 g miscelare nuovamente mediante agitatore vortex e omogeneizzare preferibilmente tramite un sonicatore, e comunque con un omogeneizzatore che permetta una adeguata sospensione del campione.

Nell'eventualità si utilizzi un omogeneizzatore tradizionale, tipo stomacher, porre il campione miscelato nel sacchetto appropriato e omogeneizzare, quindi, per 2 minuti, a bassa velocità.

Utilizzare sacchetti provvisti di rete all'interno per omogeneizzare campioni con contenuto solido secco $>20\%$, mentre sacchetti privi di rete interna possono essere impiegati per i campioni con contenuto solido secco $<20\%$. La procedura permette la disgregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

I campioni da analizzare possono contenere quantità variabili di materiale solido; pertanto, alcuni di essi potranno richiedere una fase di centrifugazione e di prefiltrazione prima di essere analizzati per filtrazione. In questo caso, trasferire tutto il contenuto del sacchetto in tubi conici sterili da centrifuga e centrifugare le aliquote per 3 minuti, impostando una velocità di $200 \div 300$ g/minuto.

Decantare in un beaker il supernatante ed eventualmente filtrare attraverso un pre-filtro in fibra di vetro di diametro di 47 mm a porosità nominale di $2,7 \mu\text{m}$ per rimuovere i detriti più fini. Per evitare intasamenti, versare il campione nell'imbuto da filtrazione lentamente. Una volta terminata la prefiltrazione, trasferire il filtrato in un contenitore sterile.

Per matrici trattate con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ agitando con cura per assicurarne un'omogeneizzazione completa. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

4.4.2. Preparazione delle diluizioni dalla sospensione primaria

Il numero di diluizioni da filtrare successivamente varia in base al livello di contaminazione presunto del materiale da sottoporre ad analisi.

Comunemente la sospensione primaria dovrebbe essere ulteriormente diluita in diluizioni seriali da 10^{-1} a 10^{-3} con soluzione di Ringer (1/4 X) (4.3.1.) Campioni con maggiori concentrazioni di batteri richiederanno diluizioni addizionali della sospensione primaria fino a 10^{-8} (per esempio i fanghi non trattati possono contenere titoli di enterococchi pari a 10^8 - 10^9 per grammo di matrice fresca).

Preparare un quantitativo di provette sterili in base al numero delle diluizioni da effettuare e dispensare in ciascuna di esse 9 mL di soluzione di Ringer (1/4 X) sterile (4.3.1.).

Mediante una pipetta sterile trasferire 1 mL della sospensione primaria nella prima provetta contenente 9 mL di soluzione di Ringer e mescolare con agitatore tipo vortex. Procedere in modo analogo per la preparazione delle altre diluizioni.

4.4.3. Filtrazione su membrana

Aggiungere nel bicchiere filtrante un quantitativo sufficiente di soluzione di Ringer (15 o 20 mL), prelevare quindi 1 mL del campione diluito e mescolato e inserire anch'esso nel bicchiere. Filtrare il campione attraverso una membrana quadrettata sterile di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con porosità nominale di $0,45 \mu\text{m}$. Mediante pinzette sterili rimuovere la membrana e trasferirla nella capsula contenente il terreno selettivo agarizzato Slanetz e Bartley (4.3.2.). Ripetere l'operazione per tutte le diluizioni preparate. Come di norma, poggiare la membrana con un movimento rotatorio per prevenire la formazione di bolle di aria. Membrane raggrinzite, strappate o danneggiate, devono essere scartate.

Prima di procedere alla filtrazione della prima diluizione aggiungere un controllo negativo costituito da 1 mL di soluzione di Ringer sterile. Dopo la filtrazione dell'ultima diluizione, aggiungere un controllo negativo (1 mL di soluzione di Ringer sterile) e un controllo positivo (sospensione di un ceppo certificato di *Enterococcus faecalis* contenente 10^2 - 10^3 microrganismi/mL).

4.4.4. Incubazione e conteggio delle colonie su substrato selettivo

Incubare le piastre inizialmente a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per $4 \pm 1/2$ ore e successivamente incrementare la temperatura a $(43 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 40 ± 4 ore.

Contare come tipiche le colonie da rosso bordeaux al rosa (comprese le colonie rosa pallido) che si presentano lisce e convesse. Per formulare l'espressione dei risultati dovranno essere prese in considerazione soltanto le piastre con un intervallo di crescita di 10 - 100 colonie.

Eventualmente, considerare conte al di fuori di questo intervallo a patto che sia possibile una quantificazione accurata.

Possono crescere su questo terreno anche alcune specie di *Bacillus*, *Aerococcus* e *Staphylococcus*. *Bacillus* spp forma colonie rosa, ma sono generalmente rugose, piatte e a volte diffuse. *Staphylococcus* spp e *Aerococcus* spp formano colonie rosse ma al test della catalasi, a differenza degli enterococchi, risultano essere catalasi positivi.

4.4.5. Conferma delle colonie

Mediante pinzette sterili rimuovere la membrana dal terreno selettivo Slanetz e Bartley e trasferirla nella capsula contenente il terreno Bile Esculina agar (BEA) (4.3.3.). Incubare per 1÷4 ore a (43±1)°C. Tutte le colonie che hanno prodotto un annerimento su BEA devono essere ulteriormente sottoposte al test di conferma della catalasi. In presenza di piastre con conte superiori a 10 colonie bile esculina positive ne va confermato un numero almeno pari a 10, trasferendo le colonie con un'ansa sterile in 1-2 gocce di soluzione di perossido di idrogeno al 3% (4.3.4.). Un'assenza di bolle indica una reazione negativa.

Gli enterococchi sono bile esculina positivi, catalasi negativi.

4.4.6. Determinazione del peso secco

Il numero di Enterococchi può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente alle analisi microbiologiche.

4.5. Espressione dei risultati

Il calcolo del numero di Enterococchi (per g di peso umido del campione originale) si ottiene moltiplicando il numero delle colonie, confermate dai test dell'idrolisi dell'esculina e della catalasi, per il fattore di diluizione complessivo.

Come sopra riportato, le membrane devono essere scelte nell'intervallo compreso tra 10 e 100 colonie tipiche.

La concentrazione di Enterococchi per g di peso umido è calcolata secondo la seguente formula:

$$c = n/abv$$

dove:

- c* è la concentrazione iniziale di Enterococchi espressa numericamente per grammo di peso umido
- n* è il numero totale di colonie tipiche confermate come Enterococchi mediante i test di conferma, contate sulle membrane selezionate
- a* è il fattore di diluizione iniziale
- b* è il fattore di diluizione seriale delle membrane selezionate
- v* è il volume filtrato attraverso le membrane selezionate.

Nello specifico, seguire quanto sotto riportato come esempio di calcolo.

Se si ottengono due conte da diluizioni seriali, che rientrano nell'intervallo ottimale 10-100, avendo filtrato volumi pari a 1 mL:

Diluizione	Conte
10 ⁻²	81 colonie
10 ⁻³	15 colonie

applicando la formula si otterrà:

n = numero totale di colonie confermate (81+15 = 96)

a = fattore iniziale di diluizione (10⁻¹)

b = fattore di diluizione delle diluizioni selezionate (10⁻² e 10⁻³)

v = volume filtrato (1 mL)

$$c = 96 / (0,1 \times 0,01 \times 1) + (0,1 \times 0,001 \times 1) = 96 / 0,0011 = 8,7 \times 10^4$$

La concentrazione per g di peso secco del campione è calcolata in base alla seguente formula:

$$c = (n/abve) \times 100$$

dove:

e = è il residuo secco (%) del campione umido originale.

5. Metodo ISS F 003B rev.00

5.1. Principio del metodo

Tecnica MPN a multi-pozzetto su substrato definito a 97 pozzetti. La tecnica permette di diluire il campione ad un livello tale da ottenere la presenza contemporanea di pozzetti positivi, sviluppo di organismi vitali, e pozzetti negativi, privi cioè di crescita batterica. La combinazione dei pozzetti positivi e negativi fornisce la stima della concentrazione dei batteri presenti nel campione originale. Per ottenere un intervallo di concentrazione più ampio l'analisi si esegue su più diluizioni seriali.

Il metodo è un esempio di tecnica a substrato definito, formulazioni chimiche determinate contenenti specifici substrati per il rilevamento di peculiari attività enzimatiche associate a particolari gruppi di organismi. Secondo questo metodo, sono considerati Enterococchi gli organismi che producono l'enzima β -D-glucosidasi a 41°C la cui presenza è evidenziata dalla produzione di fluorescenza blu del substrato quando si osserva con una lampada a luce ultravioletta ed è il risultato della scissione enzimatica del 4-metilumbelliferil- β -D-glucoside (MUD). La maggior parte dei ceppi di Enterococchi produce β -glucosidasi.

Il metodo consente di determinare la concentrazione di Enterococchi in un determinato volume di fango o matrice ad esso assimilabile, senza l'esecuzione di prove di conferma.

Il campione di fango, o di materiale ad esso assimilabile, viene inizialmente omogeneizzato e poi diluito serialmente. Il terreno disidratato viene disciolto in 99 mL di acqua deionizzata sterile alla quale viene aggiunto 1 mL della diluizione del campione di fango. La sospensione è poi versata in una busta a multi-pozzetto. La busta multi-pozzetto agisce come un sistema a tubi multipli MPN semplificato, dove il numero dei pozzetti esibenti crescita nel terreno sarà dipendente dal numero e dalla distribuzione di organismi nel campione diluito.

La busta multi-pozzetto viene sigillata e incubata alla temperatura di $(41 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 24 ore.

Il numero più probabile di organismi in 1 mL del campione diluito può essere calcolato mediante la specifica tabella di probabilità (Appendice B, Tabelle B1.1 – B1.2).

5.2. Strumentazione e vetreria

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

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

5.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi, disponibili in commercio, preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

L'uso di prodotti chimici di altro grado analitico è consentito purché sia dimostrato che, nell'analisi, essi forniscano prestazioni equivalenti.

5.3.1. Soluzione salina peptonata

Composizione		
Peptone	1	g
Cloruro di sodio	8,5	g
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Sospendere gli ingredienti in acqua distillata.

Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,0 \pm 0,2$. Riscaldare agitando frequentemente.

Sterilizzare la soluzione in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di 3 mesi in condizioni ottimali.

5.3.2. Soluzione salina di NaCl 0,9% p/V

Composizione		
Cloruro di sodio	9	g
Acqua distillata	1000	mL

Miscelare il cloruro di sodio in acqua distillata fino a completa dissoluzione. Aggiustare il pH a $7,0 \pm 0,2$. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 2 min

5.3.3. Enterolert Quanti-Tray™

Composizione		
Hepes – Acido libero	4,48	g
Hepes – Sale di sodio	8,121	g
Bicarbonato di sodio	2	g
Fosfato di potassio monobasico	1	g
Magnesio solfato eptaidrato	0,5	g
Peptone	1,5	g
Yeast Medium	7,75	g
4-metilumbelliferil- β -D-glucoside	0,1	g
Riboflavina	0,002	g
Miscela selettiva	0,02	g

Il terreno si trova anche in commercio in fiale già predosate per l'esame di 100 mL di campione o di una sua diluizione.

Il terreno, prodotto sotto forma granulare, si mantiene 24 mesi dalla data di fabbricazione. Conservare le fiale a $(4 \pm 25)^\circ\text{C}$.

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

Il prodotto è certificato come non tossico.

5.4. Procedura

5.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Il volume e le diluizioni dei campioni dovrebbero essere scelti in modo tale che il terreno non manifesti crescita nella totalità dei pozzetti. Pesare, in un contenitore adeguato, un'aliquota rappresentativa del campione pari a 10 g (peso umido). Aggiungere 90 mL di Soluzione Salina Peptonata (5.3.1.) e trattare il campione mediante sonicazione o utilizzando un omogeneizzatore tradizionale che permetta una adeguata sospensione del campione.

Nell'eventualità si utilizzi un omogeneizzatore tradizionale, tipo stomacher, trasferire il campione diluito nel sacchetto sterile appropriato ed omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità.

La procedura permette la disgregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

Per campioni trattati con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ agitando con cura per assicurarne un'omogeneizzazione completa. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

5.4.2. Preparazione delle diluizioni dalla sospensione primaria

Il numero delle diluizioni del campione da seminare successivamente varia in funzione della concentrazione stimata di Enterococchi nel campione in esame. La sospensione primaria dovrebbe essere diluita in modo seriale da 10^{-1} a 10^{-3} in soluzione salina. Livelli di contaminazione di Enterococchi più alti richiederanno ulteriori diluizioni (es. 10^{-4} ÷ 10^{-5}).

Preparare un quantitativo di provette sterili in base al numero delle diluizioni da effettuare e dispensare in ciascuna di esse 9 mL di soluzione salina di NaCl 0,9% (5.3.2.).

Mediante una pipetta sterile trasferire 1 mL della sospensione primaria nella prima provetta contenente 9 mL della soluzione salina e mescolare con un agitatore tipo vortex. Procedere in modo analogo per la preparazione delle altre diluizioni.

5.4.3. Inoculo ed incubazione delle buste multi-pozzetto

Scegliere appropriate diluizioni della sospensione primaria e prelevare da ciascuna di esse 1 mL, aggiungerlo, quindi, ad un contenitore sterile contenente agente antischioma e 99 mL di acqua distillata sterile. Non utilizzare soluzioni tamponate poiché potrebbero causare reazioni nel terreno.

Sulla base delle istruzioni della ditta produttrice, aggiungere asetticamente al contenitore il contenuto di una busta monodose di terreno Enterolert Quanti-Tray (5.3.3.).

Dopo aver chiuso il contenitore, agitare per favorire la completa dissoluzione del terreno. Lasciare, quindi, riposare per pochi minuti per facilitare la dispersione delle bolle d'aria.

Versare il contenuto del contenitore nella busta multi-pozzetto e sigillare con la termosigillatrice automatica Quanti-Tray™. Data la particolare natura della matrice, è preferibile utilizzare buste multi-pozzetto a 97 pozzetti (49 pozzetti grandi e 48 pozzetti piccoli) che permettono di ottenere conteggi fino a 2419,6 MPN rispetto a quelle a 51 pozzetti che consentono conteggi solo fino a 200,5 MPN.

Evitare l'esposizione della busta multi-pozzetto inoculata alla luce diretta del sole poiché si potrebbero manifestare reazioni false positive.

Il tempo tra l'inoculo della busta multi-pozzetto e l'inizio della fase di incubazione dovrebbe essere il più breve possibile e non superiore alle 2 ore.

Incubare le buste multi-pozzetto sigillate alla temperatura di $(41 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 24 ore.

5.4.4. Interpretazione dei risultati

Dopo l'incubazione, esaminare alla luce ultravioletta, alla lunghezza d'onda di 366 nm, la busta multi-pozzetto e registrare il numero dei pozzetti che manifestano fluorescenza azzurra.

5.4.5. Determinazione del peso secco

Il numero di Enterococchi può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente con le analisi microbiologiche.

5.5. Espressione dei risultati

Il valore dell'indice MPN degli Enterococchi può essere calcolato ed espresso sulla base di peso umido (A) o di peso secco (B).

Il numero di pozzetti con reazione positive (fluorescenza azzurra alla lampada di Wood) va contato e registrato. La concentrazione espressa come MPN degli Enterococchi è determinata mediante l'appropriata tabella probabilistica fornita dalla ditta produttrice congiuntamente al substrato Quanti-Tray™ (Appendice B, Tabella B1.1 – B1.2).

Seguire quanto sotto riportato come esempio di calcolo.

Se con il sistema MPN a 97 pozzetti, 15 pozzetti grandi e 3 pozzetti piccoli manifestano fluorescenza, dalla tabella probabilistica, il valore MPN degli Enterococchi è 21,1 per 100 mL di sospensione esaminata.

Il calcolo del numero degli Enterococchi per g di peso umido prende in considerazione il volume e le diluizioni usate.

Per il calcolo per g di peso secco è necessario prendere in considerazione anche la percentuale di sostanza secca.

Generalmente i risultati sono riportati come MPN di Enterococchi per g di sostanza secca.

Possano essere applicate, quindi, le seguenti equazioni:

A) Per il calcolo MPN, per g di matrice umida C_u , si avrà:

$$C_u = N \times b \times d/a$$

dove:

C_u è il numero di Enterococchi in 1 g di campione originale umido;

N è l'indice MPN di Enterococchi ottenuto dalla tabella probabilistica (per 100 mL di campione esaminato);

b è il fattore della diluizione iniziale, ovvero sospensione primaria, del campione sospeso in Soluzione Salina Peptonata (fattore 10);

d è il fattore di diluizione delle diluizioni seriali scelte e seminate;

a è il volume di campione diluito e inoculato (generalmente 1 mL).

B) Per il calcolo MPN, per g di matrice secca C_s si avrà:

$$C_s = C_u \times 100/e$$

dove:

- C_s è il numero di Enterococchi in 1 g di campione secco;
- C_u è il numero di Enterococchi in 1 g di campione originale umido;
- e è il contenuto percentuale di sostanza secca del campione originale umido.

Esempio

Se un'aliquota pari a 10 g di campione originale (umido) viene inizialmente diluita 10 volte e al terreno Enterolert Quanti-Tray™ si aggiunge 1 mL della diluizione 10^{-3} (campione diluito 1000 volte) e, alla lettura dei risultati, si evidenzieranno 15 pozzetti grandi e 3 pozzetti piccoli fluorescenti, l'equazione di conseguenza sarà:

$$C_u = 21,1 \times 10 \times 1000/1 = 2,1 \times 10^5$$

Se il contenuto percentuale di sostanza secca del campione originale (umido) è 7,5%, allora si avrà:

$$C_s = C_u \times 100/7,5 = 2,1 \times 10^5 \times 100/7,5 = 2,8 \times 10^6$$

6. Metodo ISS F 003C rev.00

6.1. Principio del metodo

Tecnica MPN a multi-pozzetto su substrato definito a 96 pozzetti. La tecnica permette di diluire il campione ad un livello tale da ottenere la presenza contemporanea di pozzetti positivi, sviluppo di organismi vitali, e pozzetti negativi, privi cioè di crescita batterica. La combinazione dei pozzetti positivi e negativi fornisce la stima della concentrazione dei batteri presenti nel campione originale. Per ottenere un intervallo di concentrazione più ampio l'analisi si esegue su più diluizioni seriali.

Il metodo è un esempio di tecnica a substrato definito, formulazioni chimiche determinate contenenti specifici substrati per il rilevamento di peculiari attività enzimatiche associate a particolari gruppi di organismi. Secondo questo metodo, sono considerati Enterococchi gli organismi che producono l'enzima β -glucosidasi a 43°C. Questo enzima è evidenziato dalla produzione di fluorescenza blu del substrato quando si osserva con una lampada a luce ultravioletta, ed è il risultato della scissione enzimatica del 4-metil-umbelliferil- β -D-glucoside (MUD). La maggior parte dei ceppi di Enterococchi produce β -glucosidasi.

Il rilevamento e l'enumerazione degli Enterococchi richiede le seguenti fasi:

- a) preparazione e omogeneizzazione della sospensione del campione in soluzione di Ringer (1/4 X);
- b) inoculo del campione omogeneizzato diluito in una piastra a 96 micro pozzetti contenente il terreno colturale disidratato;
- c) esame dei pozzetti, mediante l'esposizione alla luce ultravioletta a lunghezza d'onda di 366 nm dopo incubazione a 43°C per 36÷72 ore. La presenza di Enterococchi è indicata da una colorazione blu fluorescente dovuta all'idrolisi del 4-metil-umbelliferil- β -D-glucoside;
- d) per la formulazione dei risultati consultare le istruzioni della detta produttrice. Le concentrazioni di Enterococchi sono espresse come MPN per grammo di campione originale umido.

6.2. Strumentazione e vetreria

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

- Pipetta multicanale a 8 puntali, graduabile o fissa od ogni altro simile sistema per misurare e distribuire volumi pari a 200 µL in ogni pozzetto;
- Puntali sterili per pipette multicanale;
- Piastre sterili multi-pozzetto a 96 pozzetti da 350 µL, a fondo piatto, non fluorescenti;
- Pellicola adesiva sterile per sigillare le piastre multi-pozzetto;
- Lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm.

6.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi, disponibili in commercio, preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

6.3.1. Soluzione di Ringer (1/4 X)

Composizione	
Sodio cloruro	2,25 g
Potassio cloruro	0,11 g
Calcio cloruro esaidrato	0,12 g
Sodio bicarbonato	0,05 g
Acqua distillata	1000 mL

La soluzione si può preparare a partire dai singoli ingredienti, ma sono anche disponibili in commercio compresse a concentrazione idonea. Aggiungere gli ingredienti ad acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa dissoluzione. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,0 \pm 0,2$.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare la soluzione a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di due settimane.

6.3.2. Terreno MUD/SF

6.3.2.1. Soluzione A

Composizione	
Triptosio	40 g
Potassio diidrogeno fosfato	10 g
D-galattosio	2 g
Tween 80	1,5 mL
Acqua distillata	900 mL

Aggiungere gli ingredienti a 900 mL di acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa dissoluzione. Lasciare raffreddare.

6.3.2.2. Soluzione B

Composizione	
Carbonato di sodio	1 g
Acido nalidixico	250 mg
Acqua distillata	50 mL

Aggiungere gli ingredienti a 50 mL di acqua distillata, riscaldare in agitazione fino ad ottenerne la completa dissoluzione. Lasciare raffreddare.

6.3.2.3. Soluzione C

Composizione	
Tallio acetato	2 g
2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro	0,1 g
Acqua distillata	50 mL

Aggiungere gli ingredienti a 50 mL di acqua distillata, riscaldare in agitazione fino ad ottenerne la completa dissoluzione. Lasciare raffreddare.

Il Tallio acetato è classificato come molto tossico (T+) per inalazione e ingestione. Lavorare sotto cappa durante la manipolazione del terreno. Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

6.3.2.4. Soluzione D

Composizione	
MUD (4-metil-umbelliferil- β -D-glucoside)	150 mg
N-N-dimetilformammide	2 mL

La N-N-dimetilformammide è classificata come tossica (T), può danneggiare i bambini non ancora nati, nocivo (Xn) per inalazione e contatto con la pelle e irritante (Xi) per gli occhi. Lavorare sotto cappa durante la manipolazione del terreno. Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

6.3.3. Terreno MUD/SF completo

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

Miscelare insieme le soluzioni A, B, C e D. Aggiustare il pH a $7,5 \pm 0,2$. Sterilizzare per filtrazione attraverso una membrana a porosità nominale di $0,2 \mu\text{m}$. Distribuire $100 \mu\text{L}$ di terreno in ciascuno dei 96 pozzetti della piastra multi-pozzetto (capacità massima pari a $350 \mu\text{L}$) e disidratare immediatamente mediante una camera di disidratazione o sotto cappa biologica a flusso laminare.

6.4. Procedura

6.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Pesare una aliquota rappresentativa del campione pari a 25 g (peso umido) aggiungere un volume appropriato di soluzione di Ringer (1/4 X) (6.3.1.) affinché il volume finale sia pari a 250 mL e trattare il campione mediante sonicazione o utilizzando un omogeneizzatore tradizionale che permetta una adeguata sospensione del campione.

Nell'eventualità si utilizzi un omogeneizzatore tradizionale, tipo stomacher, trasferire il campione diluito nel sacchetto sterile appropriato ed omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità.

Aggiungere un volume appropriato di soluzione (6.3.1.) affinché il volume finale sia pari a 250 mL e omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità. La procedura permette la disgregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

Per campioni trattati con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ agitando con cura per assicurarne la completa omogeneizzazione. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

6.4.2. Preparazione delle diluizioni dalla sospensione primaria

Preparare la diluizione 1:2 e le successive diluizioni seriali decimali da 1:20 a 1:2.000.000 utilizzando la soluzione di Ringer (1/4 X) (6.3.1.) e procedere come segue:

- agitare vigorosamente la sospensione primaria per operare una quanto più possibile omogeneizzazione;
- trasferire immediatamente, con una pipetta sterile, 18 mL della sospensione omogenea in una provetta contenente 18 mL di soluzione di Ringer (1/4 X) ottenendo così la diluizione 1:2;
- sostituire la pipetta e trasferire 2 mL della prima diluizione in una nuova provetta contenente 18 mL di soluzione di Ringer (1/4 X) ottenendo quindi la diluizione 1:20;
- agitare la nuova diluizione per omogeneizzare e da questa seconda provetta operare la terza diluizione 1:200, trasferendone 2 mL, sempre sostituendo la pipetta, in una nuova provetta contenente 18 mL di soluzione di Ringer (1/4 X);
- continuare con questo procedimento fino a raggiungere la diluizione 1:2.000.000.

6.4.3. Inoculo e incubazione delle piastre multi-pozzetto

Scartare la diluizione 1:2 e inoculare una piastra multi pozzetto contenente terreno MUD/SF (6.3.2.), distribuendo ciascuna delle diluizioni da 1:20 a 1:2.000.000 in 16 pozzetti consecutivi.

Iniziare l'inoculo con la diluizione 1:2.000.000 e, mediante una pipetta multicanale a 8 puntali sterili, distribuirne 200 μ L in 16 pozzetti della piastra multi-pozzetto.

Operare, quindi, in modo identico per tutte le altre diluizioni, utilizzando per ciascuna delle diluizioni successive le 2 colonne consecutive a 8 pozzetti della piastra multi-pozzetto. Le ultime due colonne a 8 pozzetti della piastra dovranno corrispondere alla diluizione 1:20.

In alternativa qualunque altro sistema adeguato può essere utilizzato per distribuire 200 μ L per pozzetto di ciascuna diluizione.

Coprire quindi con l'apposita pellicola adesiva e incubare a $(43 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 36÷72 ore.

Manipolare con cura le piastre multi pozzetto ed evitare accidentali ribaltamenti.

Seguire attentamente le istruzioni della ditta produttrice.

6.4.4. Interpretazione dei risultati

Dopo l'incubazione esporre ogni piastra multi pozzetto, coperta con la pellicola adesiva, a luce ultravioletta a lunghezza d'onda di 366 nm.

Considerare come positivi, per ciascuna diluizione, tutti i pozzetti in cui si osserva una fluorescenza blu con un deposito rosso e registrarne il numero.

6.4.5. Determinazione del peso secco

Il numero di Enterococchi può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente con le analisi microbiologiche.

6.5. Espressione dei risultati

6.5.1. Determinazione del numero caratteristico (NC)

Annotare il numero dei pozzetti positivi per ciascuna delle 6 diluizioni inoculate e individuare il numero caratteristico (NC) corrispondente secondo le istruzioni contenute nella norma UNI EN ISO 8199 per il calcolo del valore MPN.

L'NC corrisponde al numero dei pozzetti positivi delle ultime 3 diluizioni, che danno come risultato un numero di pozzetti positivi, come nello schema seguente:

Esempi per la determinazione dell'NC

Diluizione	1/20	1/200	1/2000	1/20000	1/200000	1/2000000	NC
Esempio							
a	16	16	9	3	0	0	16/9/3
b	16	16	9	7	1	0	9/7/1
c	12	5	0	0	0	0	12/5/0
d	0	1	0	0	0	0	0/1/0

Quando possibile, scegliere 3 diluizioni seriali che risultino né tutte positive e né tutte negative. Se ciò non fosse possibile, scegliere 3 diluizioni con risultati positivi piuttosto che con risultati negativi (esempi a e b).

Se meno di 3 diluizioni danno risultati positivi, partire dalla diluizione contenente la concentrazione più alta e proseguire con le 2 diluizioni successive (esempio c).

Se si verifica il caso che soltanto per una delle diluizioni seriali ci siano pozzetti positivi, partire da questa diluizione e selezionare la diluizione precedente e quella successiva (esempio d).

6.5.2. Calcolo del numero più probabile (MPN) e dell'intervallo di confidenza

Per il calcolo del valore dell'MPN seguire le istruzioni della ditta produttrice.

Al valore MPN sono attribuiti intervalli di confidenza (IC al 95%).

Per il calcolo del valore dell'MPN seguire le istruzioni della ditta produttrice.

Il valore del numero MPN corrispondente all'NC individuato può essere ottenuto dall'apposita tabella MPN fornita assieme al prodotto commerciale dalla ditta produttrice.

Procedere quindi individuando l'MPN intermedio (MPN_i) derivandolo dall'NC corrispondente nella tabella.

Il valore MPN finale per mL di sospensione, tenendo in considerazione i fattori di diluizione corrispondenti all'NC, deve essere calcolato dall'MPN intermedio (MPN_i) come segue:

- se NC corrisponde alle diluizioni 1:20; 1:200 e 1:2.000,
l'MPN per mL di sospensione primaria corrisponde all'MPN_i (MPN/mL = MPN_i);

- se NC corrisponde alle diluizioni 1:200; 1:2.000 e 1:20.000, l'MPN per mL di sospensione primaria corrisponde all'MPN_i moltiplicato per un fattore 10 (MPN/mL=10 × MPN_i);
- se NC corrisponde alle diluizioni 1:2.000; 1:20.000 e 1:200.000, l'MPN per mL di sospensione primaria corrisponde all'MPN_i moltiplicato per un fattore 100 (MPN/mL =100xMPN_i);
- se NC corrisponde alle diluizioni 1:20.000; 1:200.0000 e 1:2.000.000, l'MPN per mL di sospensione primaria corrisponde all'MPN_i moltiplicato per un fattore 1000 (MPN/mL = 1000 × MPN_i).

Il risultato per grammo di peso umido si calcola quindi secondo la seguente formula:

$$C_u = N \times V/p$$

dove:

- C_u è la concentrazione di Enterococchi in 1 g di campione originale umido;
- N è l'indice MPN di Enterococchi per mL di sospensione primaria ottenuto come spiegato nei precedenti punti 1÷4;
- V è il volume della sospensione primaria, ovvero 250 mL;
- p è il peso del campione analizzato, ovvero 25 g.

Il risultato per grammo di peso secco si calcola quindi secondo la seguente formula:

$$C_s = C_u \times 100/e$$

dove:

- C_s è la concentrazione di Enterococchi in 1 g di campione secco;
- C_u è la concentrazione di Enterococchi in 1 g di campione originale umido;
- e è il contenuto percentuale di sostanza secca del campione originale umido.

Per utilità, si riporta un esempio di calcolo:

1:20	16 pozzetti positivi su 16
1:200	16 pozzetti positivi su 16
1:2.000	12 pozzetti positivi su 16
1: 20.000	5 pozzetti positivi su 16
1:200.000	0 pozzetti positivi su 16
1:2.000.000	0 pozzetti positivi su 16

In questo esempio l'NC è 16/12/5 corrispondente alle diluizioni 1:200; 1:2.000; 1:20.000 e il corrispettivo valore MPN_i nella tabella statistica MPN è 1.758,2/mL, con IC con un limite inferiore di 1.018,2/mL e uno superiore di 3.036,2/mL.

Il valore MPN della sospensione è quindi 17.582/mL (limite inferiore = 10.182/mL; limite superiore = 30.362/mL).

Il risultato per grammo di peso umido quindi sarà:

$$175.820 \text{ Enterococchi MPN/g}_u$$

(limite inferiore = 101.820 MPN/g_u; limite superiore = 303.620 MPN/g_u)

Se nessuno dei pozzetti risulta positivo, esprimere il risultato nella seguente forma:

$$< n/\text{mL}$$

dove:

- n rappresenta il valore MPN per 1 pozzetto positivo alle diluizioni impiegate.

Se tutti i pozzetti sono positivi, esprimere il risultato come segue:

> n /mL

dove:

n rappresenta il valore MPN più basso per tutti i pozzetti positivi alle condizioni di diluizione impiegate.

Bibliografia

- Bartram J, Rees G (Ed.). *Monitoring bathing waters*. London and New York: E & FN Spon; 2003.
- Bonadonna L, Cataldo C. Enterococchi nelle acque: metodo di analisi e significato sanitario. *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA-CNR* 2007;2:10-2.
- Figaroli BM, Ossiprandi MC. Ceppi antibiotico-resistenti di *Enterococcus* *Ann Fac Medic Vet di Parma* 2006;26:219-234.
- UNI EN 12880. *Caratterizzazione dei fanghi - Determinazione del residuo secco e dell'umidità*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.
- UNI EN ISO 8199. *Qualità dell'acqua - Linea guida generale per la conta di microrganismi su terreno di coltura*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.

DETERMINAZIONE DELLE SPORE DI *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Clostridium perfringens* rilevato con i metodi ISS F (004A rev. 00; 004B rev. 00; 004C rev. 00).

Clostridium perfringens, presente nel materiale fecale dell'uomo in concentrazioni variabili tra 10^2 e 10^7 UFC/g, è considerato utile indicatore di contaminazione in quanto specie di sicura origine fecale; esso è in grado di segnalare la presenza di microrganismi con caratteristiche analoghe (elevata resistenza nell'ambiente, a variabili condizioni di temperatura, e ai biocidi). Esso è presente anche nelle feci canine e suine ed è meno comune, o addirittura assente, nelle feci degli altri animali a sangue caldo. Nei reflui le concentrazioni del microrganismo possono raggiungere valori intorno a 10^5 UFC/100 mL.

I microrganismi appartenenti al genere sono bacilli Gram-positivi (talora debolmente Gram-positivi o anche Gram-negativi), che riducono il solfito con produzione di solfuri e producono spore termoresistenti e stabili nell'ambiente. In particolare, *C. perfringens* cresce su terreni contenenti solfito, non è motile, riduce i nitrati a nitriti, è in grado di metabolizzare il 4-metilumbelliferone fosfato, fermenta il lattosio e liquefa la gelatina in circa 48 ore.

Nel genere è una delle specie anaerobie obbligate che mancano del sistema dei citocromi e di catalasi, e producono ATP esclusivamente mediante reazioni di fosforilazione a livello del substrato. La verifica dell'assenza dell'enzima catalasi è una delle prove biochimiche utili per distinguerlo dalle diverse specie appartenenti al genere *Bacillus*.

La temperatura è un parametro discriminante per i clostridi: ad esempio, alcuni ceppi di *C. perfringens* sono molto più sensibili all'azione del calore rispetto ad altri che lo sono meno. Inoltre, molti ceppi di *C. perfringens* crescono a 44°C, caratteristica che può essere sfruttata per migliorare la specificità e il recupero del microrganismo nei campioni ambientali.

L'elemento distintivo, rispetto ad altri gruppi batterici, che contraddistingue le specie appartenenti al genere *Clostridium* è la produzione di spore, forme conservative del microrganismo che rimangono quiescenti per lungo tempo e non si riproducono nell'ambiente. Le spore, termoresistenti a localizzazione terminale o subterminale, sono strutture differenziate resistenti al calore, alla disidratazione, ai raggi ultravioletti, al congelamento, e sono difficilmente distrutte anche con i disinfettanti se si considera che la loro resistenza al cloro, rispetto a quella dell'*Escherichia coli*, è maggiore di circa 30÷90 volte.

La longevità e la resistenza delle spore sono da attribuire alla particolarità della struttura interna che si presenta più complessa delle cellule vegetative da cui esse originano: sono costituite da diversi strati esterni alla parete cellulare non presenti nella cellula matura. Il complesso calcio-acido dipicolinico, presente nel core, è assente nelle cellule vegetative. Il grado di disidratazione della zona centrale (10% rispetto all'80-90% della cellula vegetativa) causa una parziale inattività enzimatica, aumenta la resistenza al calore e ad alcune sostanze chimiche come il perossido di idrogeno (H_2O_2). Durante il processo di sporulazione si formano nel citoplasma proteine core-specifiche che legano fortemente il DNA al core proteggendolo dai potenziali danni associati ai fattori ambientali. Queste proteine funzionano come fonte di carbonio e di energia per la nuova cellula vegetativa al momento della germinazione. Per accelerare l'attività di germinazione, le spore generalmente vengono sottoposte a trattamento termico a temperatura subletale (80÷85)°C. Esistono comunque fattori che impediscono la

germinazione delle spore e che sono rappresentati da presenza di condizioni acide, di acqua libera e di un ambiente non strettamente anaerobio. Tuttavia è stato anche dimostrato che la germinazione può avere luogo senza trattamento termico in un intervallo di temperatura variabile tra 3÷37°C.

Così come nei fanghi, la ricerca di *C. perfringens* può essere significativa anche in sedimenti, ammendanti organici e suoli dove coesistono le condizioni necessarie per lo sviluppo di questo microrganismo (assenza di ossigeno e alto tenore di sostanza organica).

Nei sedimenti le sue concentrazioni possono oscillare ampiamente tra 10^1 e 10^4 UFC/g. Valori più elevati (10^3 - 10^5 UFC/g) possono comunque essere registrati in sedimenti fluviali in corrispondenza di apporti di tipo organico. È importante notare che il microrganismo può essere considerato un valido indicatore di contaminazione e un supporto per la valutazione della qualità di diverse matrici ambientali assimilabili come sabbie e prodotti di compostaggio, nonché, anche quando si debba stimare la qualità di acque superficiali e reflue che contengono scarichi industriali letali per i microrganismi non sporigeni.

Il presente capitolo contiene tre metodi per la determinazione di *Clostridium perfringens*:

- Metodo ISS F 004A rev.00
con tecnica della filtrazione su membrana.
- Metodo ISS F 004B rev.00
con tecnica della filtrazione su membrana con terreno modificato.
- Metodo ISS F 004C rev.00
con tecnica della conta del valore dell'MPN.

1. Campo di applicazione

Le procedure di analisi descritte possono essere utilizzate per il rilevamento di *C. perfringens* in campioni di fanghi di depurazione, altri fanghi trattati e non trattati, ammendanti organici e rifiuti organici, compost, suoli anche concimati e sedimenti.

Il metodo è particolarmente adatto anche per valutare l'efficienza delle procedure di trattamento volte all'abbattimento di patogeni nei fanghi di depurazione.

2. Termini e definizioni

In relazione ai metodi descritti, si applicano i seguenti termini e definizioni.

- *Clostridium perfringens*: batterio bastoncellare, Gram-positivo, sporigeno che produce colonie nere, grigie e giallo-bruno alla temperatura di 44°C su terreno contenente solfito. Non motile, abile a ridurre i nitrati a nitriti, a fermentare il lattosio, a liquefare la gelatina e a metabolizzare il 4-metilumbelliferone fosfato (MUP).
- *Forme vegetative*: batteri in grado di crescere normalmente in terreni liquidi o agarizzati che non necessitano di pre-rivitalizzazione.
- *Spore*: endospore formate da *C. perfringens* che sono resistenti al calore.
- *Batteri danneggiati sub-letalmente*: cellule batteriche stressate, ma non uccise, dal processo di conservazione, da fattori ambientali o dai trattamenti.

- *Rivitalizzazione*: consiste nella stimolazione della crescita vegetativa di batteri danneggiati e per questo non in grado di crescere direttamente su terreno agarizzato.
- *Positivi presuntivi*: isolati sospetti *Clostridium perfringens* da sottoporre a conferma.
- *Unità Formanti Colonia (UFC)*: è un valore che rappresenta il numero di colonie visibili formate da singole cellule batteriche cresciute su piastre agarizzate.
- *Numero più probabile (Most Probable Number, MPN)*: numero ricavato da una specifica tabella considerando ogni tubo o pozzetto il cui inoculo contenga anche un solo organismo vitale che produrrà crescita rilevabile e/o una variazione del terreno. I singoli tubi o pozzetti del campione sono indipendenti.
- *Sospensione primaria*: è la prima diluizione effettuata sul campione
- *Residuo secco*: la porzione di massa secca del materiale ottenuta dopo uno specifico processo di essiccazione. Viene espresso come percentuale oppure in grammi per chilo.

3. Campionamento e conservazione del campione

Durante il campionamento operare attenendosi alle usuali regole di sicurezza e utilizzare preferibilmente dispositivi di protezione individuale.

Prelevare campioni mai inferiori a 100 g di peso umido e trasferirli in laboratorio entro le 24 ore successive al prelievo.

Durante il trasporto e lo stoccaggio, per evitare fenomeni di moltiplicazione o inattivazione cellulare, mantenere refrigerati i campioni a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per un massimo di 36 ore.

Tenere i campioni lontano da alimenti e bevande e protetti da eventuali rotture del contenitore.

4. Metodo ISS F 004A rev.00

4.1. Principio del metodo

Tecnica della filtrazione su membrana. Consente di determinare, in campioni ambientali solidi, la concentrazione di spore di *C. perfringens* che formano colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione in condizioni anaerobiche a $(44\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 21 ± 3 ore, si contano le colonie tipiche (*C. perfringens* presuntivo) e si sottopongono a conferma.

La procedura consiste in una serie di fasi successive così suddivise:

- a) preparazione della sospensione del campione;
- b) pre-trattamento del campione;
- c) filtrazione del campione;
- d) conteggio ed identificazione delle colonie;
- e) eventuale conferma delle colonie.

4.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A).

4.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice. L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

4.3.1. Triptosio Solfito Cicloserina Agar

4.3.1.1. Triptosio Solfito Agar Base

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

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

4.3.1.2. Soluzione di D-cicloserina

Composizione	
D-cicloserina	4 g
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere la D-cicloserina in acqua distillata e sterilizzare per filtrazione su una membrana con pori di porosità nominale di $0,2\ \mu\text{m}$.

Conservare la soluzione a $(-20\pm 5)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali. Il supplemento è anche disponibile in commercio in fiale già pronte per l'uso.

4.3.1.3. Terreno completo al Triptosio Solfito Cicloserina Agar

Composizione	
Terreno di base	1000 mL
Soluzione di D-cicloserina	10 mL

Sciogliere il terreno di base e far raffreddare a $(50\pm 5)^{\circ}\text{C}$. Rispettando le comuni regole di asepsi, aggiungere 10 mL di soluzione di D-cicloserina (4.3.1.2.) a 1 L di terreno. Miscelare con cura evitando la formazione di bolle. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare.

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

È opportuno preparare il terreno al momento dell'uso, eventualmente conservare a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di 48 ore in condizioni ottimali; prove di laboratorio hanno messo in evidenza che la resa del terreno è ampiamente influenzata dal tempo e dalle condizioni di conservazione e,

pertanto, il tempo di conservazione del terreno completo, in condizioni refrigerate, non dovrebbe superare le 48 ore.

4.3.2. Soluzione di perossido di idrogeno al 3% (prova della catalasi)

Composizione	
Perossido di idrogeno	3 mL
Acqua distillata	100 mL

Preparare asetticamente e conservare a temperatura ambiente per una settimana.

4.3.3. Terreno al nitrato e per la motilità

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

Dissolvere tutti gli ingredienti, tranne il glicerolo, in 950 mL di acqua distillata portando a ebollizione. Sciogliere, separatamente, in una beuta il glicerolo in 50 mL di acqua distillata e aggiungere la soluzione al terreno, mescolando accuratamente.

Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,3 \pm 0,1$.

Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo. Sterilizzare a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

4.3.4. Reagente A al nitrato

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

Dissolvere l'acido sulfanilico in acido acetico e filtrare attraverso carta da filtro. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione.

Conservare, accuratamente chiuso, in bottiglie scure a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$.

Prima dell'utilizzo leggere attentamente la scheda di sicurezza del prodotto.

4.3.5. Reagente B al nitrato

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

Dissolvere il 5-amino-2-naftelene-acido sulfanilico in acido acetico e filtrare attraverso carta da filtro. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione.

Conservare, accuratamente chiuso, in bottiglie scure a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$.

Prima dell'utilizzo leggere attentamente la scheda di sicurezza del prodotto e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

4.3.6. Terreno al lattosio – gelatina

4.3.6.1. Terreno al lattosio – gelatina base

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

Dissolvere gli ingredienti in acqua distillata.

4.3.6.2. Soluzione di rosso fenolo

Composizione	
Rosso fenolo	4 g
Acqua distillata	100 mL

Dissolvere il rosso fenolo in acqua distillata.

4.3.6.3. Lattosio

4.3.6.4. Terreno al lattosio – gelatina completo

Composizione	
Terreno al lattosio-gelatina base	1000 mL
Lattosio	10 g
Soluzione di rosso fenolo	12,5 mL

Ad 1 L di terreno di base al lattosio – gelatina disciolto (4.3.6.1.) aggiungere 10 g di lattosio (4.3.6.3.) e 12,5 mL della soluzione di rosso fenolo (4.3.6.2.). Miscelare con cura evitando la formazione di bolle. Se necessario aggiustare il pH $7,5\pm 0,1$. Distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo. Sterilizzare a $(121\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

4.3.7. Agar con 5% di sangue di cavallo

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

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

Composizione	
Tryptone	20 g
Glucosio	1 g
Disodio idrogeno fosfato	2 g
Nitrato di potassio	1 g
Agar	1 g
Acqua distillata	1000 mL

Il terreno può essere usato in alternativa al Terreno al nitrato e per la motilità (4.3.3.) per la verifica della riduzione dei nitrati a nitriti e della motilità.

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Per l'eventuale verifica della motilità aggiungere 2 g di agar ogni litro di terreno.

Dopo avere disciolto la polvere in 1 L di acqua distillata. Se necessario aggiustare il valore del pH a $7,2\pm 0,2$ e distribuire in tubi in ragione di circa 10 mL/tubo. Sterilizzare a $(121\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di una settimana in condizioni ottimali.

4.3.9. α -naftolo

Il prodotto si trova disponibile in commercio. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione. Prima dell'utilizzo leggere attentamente la scheda di sicurezza del prodotto.

4.3.10. Soluzione fisiologica tamponata

Composizione	
Sodio cloruro	8,5 g
Potassio fosfato bibasico	1 g
Potassio fosfato monobasico	3 g
Acqua distillata	1000 mL

La soluzione si prepara a partire dai singoli ingredienti. Aggiungere i vari componenti all'acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa dissoluzione. Se necessario aggiustare il pH a $7,2\pm 0,2$.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a $(121\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare la soluzione a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese.

4.3.11. Soluzione di Ringer (1/4 X)

Composizione	
Sodio cloruro	2,25 g
Potassio cloruro	0,11 g
Calcio cloruro esaidrato	0,12 g
Sodio bicarbonato	0,05 g
Acqua distillata	1000 mL

La soluzione si può preparare a partire dai singoli ingredienti, ma sono anche disponibili in commercio compresse a concentrazione idonea. Aggiungere gli ingredienti ad acqua distillata, riscaldare fino a ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa dissoluzione. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,0\pm 0,2$.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a $(121\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare la soluzione a $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ per non più di due settimane.

4.4. Procedura

4.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Pesare un sub-campione rappresentativo di 25 g in peso umido in un contenitore da 250 mL. Aggiungere soluzione fisiologica tamponata (4.3.10.) o soluzione di Ringer (1/4 X) (4.3.11.) in un volume appropriato in modo che il peso finale sia pari a 250. Omogeneizzare preferibilmente tramite un sonicatore, o utilizzando un omogeneizzatore tradizionale che permetta una adeguata sospensione del campione.

Nell'eventualità si utilizzi un omogeneizzatore tradizionale, tipo stomacher, porre il campione miscelato nel sacchetto appropriato e omogeneizzare per 2 minuti, a bassa velocità.

Utilizzare sacchetti provvisti di rete all'interno per omogeneizzare campioni con contenuto solido secco >20%, mentre sacchetti privi di rete interna possono essere impiegati per i campioni con contenuto solido secco <20%. La procedura permette la disgregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

I campioni da analizzare possono contenere quantità variabili di materiale solido; pertanto, alcuni di essi potranno richiedere una fase di centrifugazione e di prefiltrazione prima di essere analizzati per filtrazione. In questo caso, trasferire tutto il contenuto del sacchetto in tubi conici sterili da centrifuga e centrifugare le aliquote per 3 minuti, impostando una velocità di 200÷300 g/minuto.

Decantare in un beaker il supernatante ed eventualmente filtrare attraverso un pre-filtro in fibra di vetro di diametro di 47 mm a porosità nominale di 2,7 µm per rimuovere i detriti più fini. Per evitare intasamenti, versare il campione nell'imbuto da filtrazione lentamente. Una volta terminata la prefiltrazione, trasferire il filtrato in un contenitore sterile.

Per matrici trattate con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ agitando con cura per assicurarne un'omogeneizzazione completa. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

4.4.2. Pretrattamento del campione

La procedura permette di distruggere le forme microbiche vegetative attivando contemporaneamente la germinazione delle forme sporali.

Prelevare un volume della sospensione primaria (4.4.1.) adeguato allo svolgimento delle successive diluizioni e analisi. Trasferirlo in un contenitore appropriato provvisto di chiusura ermetica e porlo in acqua fredda. Riscaldare a $(75 \pm 5)^\circ\text{C}$ per 15 minuti, provvedendo che la temperatura si mantenga costante; il progressivo riscaldamento innesca il meccanismo di germinazione delle spore. Dopo tale periodo raffreddare tempestivamente sotto acqua fredda prima di procedere alle analisi.

4.4.3. Preparazione delle diluizione dalla sospensione primaria pretrattata

Il numero di diluizioni da filtrare successivamente varia in funzione della concentrazione stimata di spore di *C. perfringens* presenti nel campione.

La sospensione primaria dopo il pretrattamento dovrebbe essere ulteriormente diluita in diluizioni seriali da 10^{-1} a 10^{-3} con soluzione fisiologica tamponata (4.3.10.). Campioni con maggiori concentrazioni di batteri richiederanno diluizioni addizionali della sospensione primaria fino a 10^{-4} ÷ 10^{-5} .

Preparare un quantitativo di provette sterili in base al numero delle diluizioni da effettuare e dispensare in ciascuna di esse 9 mL di soluzione fisiologica tamponata (4.3.10.).

Mediante una pipetta sterile trasferire 1 mL della sospensione primaria pretrattata nella prima provetta contenente i 9 mL di soluzione fisiologica tamponata e mescolare con agitatore tipo vortex. Procedere in modo analogo per la preparazione delle altre diluizioni.

4.4.4. Isolamento

Aggiungere nel bicchiere filtrante un quantitativo sufficiente di soluzione fisiologica tamponata sterile (4.3.10.) (15 o 20 mL), prelevare quindi 1 mL della sospensione primaria trattata. Filtrare il campione attraverso una membrana quadrettata sterile di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con porosità nominale di 0,45 µm. Mediante pinzette sterili rimuovere la membrana e trasferirla nella capsula contenente il terreno selettivo Triptosio Solfito Cicloserina Agar (4.3.1.3.). Ripetere l'operazione per tutte le diluizioni preparate. Come di norma, poggiare la membrana con un movimento rotatorio per prevenire la formazione di bolle di aria. Membrane raggrinzite, strappate o danneggiate, devono essere scartate.

Prima di procedere alla filtrazione della prima diluizione aggiungere un controllo negativo costituito da 1 mL di soluzione fisiologica tamponata sterile. Dopo la filtrazione dell'ultima diluizione, aggiungere un controllo negativo (1 mL di soluzione fisiologica tamponata sterile) e un controllo positivo (sospensione di un ceppo certificato di *C. perfringens* contenente 10^2 - 10^3 microrganismi/mL).

4.4.5. Incubazione e conteggio delle colonie su substrato selettivo

Incubare le piastre alla temperatura di $(44\pm 1)^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore in condizioni di anaerobiosi.

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

Ridurre al minimo il tempo tra l'analisi e l'incubazione delle piastre seminate.

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

4.4.6. Conferma delle colonie

Confermare tutte le colonie presuntive *C. perfringens*, o un loro numero comunque rappresentativo; in presenza di piastre con conte superiori a 10 colonie tipiche ne va confermato un numero almeno pari a 10.

Prima di procedere allo svolgimento delle prove di conferma trasferire, con un'ansa sterile, la colonia da saggiare sulla superficie di due piastre contenenti Agar nutritivo al sangue (4.3.7.).

Incubare una piastra a $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ per 24 ore in anaerobiosi e l'altra alla stessa temperatura per 24 ore, ma in aerobiosi.

Dopo incubazione esaminare la presenza o assenza di crescita. Le colonie di *C. perfringens* producono tipiche aree di emolisi chiarificate sulla superficie del terreno. Sottoporre alle prove di conferma solo le colonie cresciute in anaerobiosi.

Procedere allo svolgimento del test della catalasi, trasferendo le colonie con un'ansa sterile in 1-2 gocce di soluzione di perossido di idrogeno al 3% (4.3.2.). Un'assenza di bolle indica una reazione negativa. *C. perfringens* è catalasi negativo.

In alternativa alle prove biochimiche di seguito descritte, per la conferma dell'appartenenza alla specie *C. perfringens*, le colonie sospette possono essere sottoposte direttamente a saggi di identificazione con i sistemi biochimici miniaturizzati disponibili in commercio. Altrimenti procedere allo svolgimento delle prove per la riduzione dei nitrati a nitriti/motilità e della produzione acido da lattosio/fluidificazione della gelatina.

4.4.6.1. Prova della riduzione dei nitrati e per la motilità

Immediatamente prima dell'uso sciogliere il Terreno al nitrato e per la motilità (4.3.3.) in bagnomaria, mantenendo in ebollizione l'acqua per circa 10 minuti. Raffreddare rapidamente. Inoculare nel terreno con un ago sterile la colonia sospetta e incubare a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 21 ± 3 ore in condizioni di anaerobiosi. Dopo incubazione verificare la crescita lungo la linea di infissione, la motilità si evidenzia come crescita diffusa oltre tale linea. *C. perfringens* non è motile.

Verificare quindi la riduzione dei nitrati a nitriti aggiungendo a ciascun tubo di Terreno al nitrato e per la motilità (4.3.3.) una miscela in rapporto 1:1, preparata immediatamente prima dell'uso, del reagente A al nitrato (4.3.4.) e del reagente B al nitrato (4.3.5.) in ragione di 0,2 - 0,5 mL per tubo. Lo sviluppo di un colore rosso conferma la presenza di nitrito prodotto dalla riduzione del nitrato.

Se entro 15 minuti non si rileva la colorazione rossa, aggiungere, con una spatola, una piccola quantità di polvere di zinco e attendere 10 minuti.

Se dopo l'aggiunta di polvere di zinco, si sviluppa un colore rosso, la riduzione del nitrato non ha avuto luogo e la prova è considerata negativa; se non si sviluppa un colore rosso, il nitrato è stato completamente convertito ad azoto e la prova è considerata positiva. *C. perfringens* riduce i nitrati a nitriti.

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

Inoculare nel brodo indolo - nitrato e per la motilità (alternativo) (4.3.8.), con un ago sterile, la colonia sospetta e incubare in condizioni di anaerobiosi a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per $24 + 24$ ore. Dopo incubazione verificare la crescita lungo la linea di infissione; la motilità si evidenzia come crescita diffusa oltre tale linea. *C. perfringens* non è motile.

Per la verifica della riduzione del nitrato a nitrito aggiungere poche gocce di α -naftolo (4.3.9.) a ciascun tubo che presenta crescita. Lo sviluppo di un colore rosa/rosso conferma la presenza di nitrito prodotto dalla riduzione del nitrato. Se entro 15 minuti non si rileva la colorazione rosa/rossa, aggiungere, con una spatola, una piccola quantità di polvere di zinco ed attendere 10 minuti.

Se si sviluppa un colore rosso, dopo l'aggiunta di polvere di zinco, la riduzione del nitrato non ha avuto luogo e la prova è considerata negativa; se non si sviluppa un colore rosso il nitrato è stato completamente convertito ad azoto e la prova è considerata positiva. *C. perfringens* riduce i nitrati a nitriti.

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

Immediatamente prima dell'uso sciogliere, in bagnomaria, il Terreno al lattosio-gelatina (4.3.6.4.) mantenendo l'acqua in ebollizione per circa 10 minuti. Raffreddare rapidamente. Inoculare nel terreno, con un ago sterile, la colonia sospetta e incubare in condizioni di anaerobiosi a $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per 21 ± 3 ore. Dopo incubazione, verificare lo sviluppo di una colorazione gialla per la produzione di acido dal lattosio.

Raffreddare i tubi per $1\div 2$ ore a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ e verificare la fluidificazione della gelatina. Dopo 1 ora, controllare se si è prodotta la solidificazione del terreno; in caso negativo, mantenere i tubi a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per un'ulteriore altra ora. Se dopo tale tempo in condizioni di refrigerazione il terreno si presenta semiliquido la reazione è da considerarsi positiva per l'idrolisi della gelatina. Se il

terreno rimane solidificato re-incubare, in condizioni di anaerobiosi, a $(36\pm 1)^\circ\text{C}$ per ulteriori 21 ± 3 ore e ripetere la verifica. Se a questo punto il terreno si presenta ancora allo stato solido la reazione è da considerarsi negativa. *C. perfringens* è in grado di liquefare la gelatina.

4.4.7. Interpretazione dei risultati

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

4.4.8. Determinazione del peso secco

Il numero di spore di *C. perfringens* può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880:2002; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente con le analisi microbiologiche.

4.5. Espressione dei risultati

Riportare il numero di spore di *C. perfringens* come UFC/g di campione (peso umido), calcolando il numero di microrganismi sulla base della seguente formula:

$$C_u = an/fbv_f1$$

dove:

- C_u è la concentrazione di *C. perfringens* per peso umido espressa come numero per grammo;
- a è il numero di colonie confermate;
- n è il numero di colonie caratteristiche contate;
- f è il fattore di diluizione delle diluizioni seriali selezionate;
- b è il numero di colonie sottoposte a conferma;
- v_i è il volume di campione analizzato;
- f_1 è il fattore di diluizione della sospensione primaria.

Il numero di colonie per g di peso secco del campione è calcolato, invece, in base alla formula:

$$C_s = C_u \times 100/e$$

dove:

- e = residuo secco percentuale del campione umido originale (UFC/g di peso secco).

5. Metodo ISS F 004B rev.00

5.1. Principio del metodo

Tecnica della filtrazione su membrana con terreno modificato. Si basa sulla capacità di *C. perfringens* di metabolizzare il 4-metilumbelliferil fosfato (MUP) usando l'enzima acido

fosfatasi per produrre 4-metilumbelliferone che fluoresce quando esposto a luce ultravioletta alla lunghezza d'onda di 366 nm.

La riduzione del sodio metabisolfito e la susseguente reazione con ferro ammonio citrato produce annerimento delle colonie. La cicloserina, che inibisce lo sviluppo di flora batterica concomitante, consente una ridotta dimensione delle colonie di *C. perfringens*, riducendo anche l'annerimento diffuso del pigmento intorno alle colonie.

I campioni omogeneizzati e diluiti vengono filtrati e la membrana, rimossa asepticamente, viene posta su terreno selettivo Triptosio Solfito Cicloserina Agar modificato e incubata in condizione di anaerobiosi a $(43\pm 1)^\circ\text{C}$ per 22 ± 2 ore. La presenza del batterio è evidenziata da tipiche colonie di colore grigio-nero fluorescenti quando esposte a luce ultravioletta alla lunghezza d'onda di 366 nm.

5.2. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A) è necessario avere a disposizione una lampada di Wood a 366 nm.

5.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

5.3.1. Soluzione di Ringer (1/4 X)

Composizione	
Sodio cloruro	2,25 g
Potassio cloruro	0,11 g
Calcio cloruro esaidrato	0,12 g
Sodio bicarbonato	0,05 g
Acqua distillata	1000 mL

La soluzione si può preparare a partire dai singoli ingredienti, ma sono anche disponibili in commercio compresse a concentrazione idonea.

Aggiungere gli ingredienti ad acqua distillata, riscaldare fino a ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa dissoluzione. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,0\pm 0,2$.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a $(121\pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare la soluzione a $5\pm 3^\circ\text{C}$ per non più di due settimane.

5.3.2. Metilumbelliferilfosfato sale bisodico (MUP)

Composizione	
4-metilumbelliferilfosfato sale bisodico (MUP)	100 mg
Acqua distillata	5 mL

Il supplemento si trova in commercio in fiale. Nella preparazione, seguire le istruzioni della ditta produttrice. Aggiungere il MUP all'acqua distillata e sterilizzare filtrando con una membrana di porosità nominale 0,2 µm.

5.3.3. D-cicloserina

Composizione	
D-cicloserina	400 mg
Acqua distillata	5 mL

Il supplemento si trova in commercio in fiale. Nella preparazione, seguire le istruzioni della ditta produttrice. Aggiungere la D-cicloserina all'acqua distillata e sterilizzare filtrando con una membrana di porosità nominale 0,2 µm.

5.3.4. Triptosio solfito cicloserina agar modificato completo (mTSC agar)

Composizione	
Triptosio	15 g
Peptone di soia	5 g
Estratto di lievito	5 g
Sodio metabisolfito	1 g
Ferro ammonio citrato	1 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL

Aggiungere i reagenti ad 1 L di acqua distillata e scaldare fino ad ebollizione. Se necessario aggiustare il pH 7,2±0,2. Sterilizzare in autoclave a (121±3)°C per 15±1 minuti. Raffreddare alla temperatura di circa 50°C e aggiungere rispettivamente 5 mL della soluzione D-cicloserina (5.3.3.) e 5 mL della soluzione MUP (5.3.2.). Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Non conservare il terreno solidificato in quanto non può essere ridisciolti. Il terreno deve essere preparato fresco al momento dell'uso e le piastre solidificate possono essere conservate al massimo per 4 giorni al buio a (5±3)°C.

5.3.5. Soluzione di Polimixina β solfato e D-cicloserina

Composizione	
Polimixina β solfato	25 mg
D-cicloserina	440 mg
Acqua distillata	10 mL

Il supplemento si trova in commercio in fiale. Nella preparazione, seguire le istruzioni della ditta produttrice. Aggiungere la Polimixina β solfato e la D-cicloserina all'acqua distillata e sterilizzare filtrando con una membrana di porosità nominale 0,2 µm.

5.3.6. Soluzione di Fenoltaleina difosfato

Composizione	
Fenoltaleina difosfato	0,1 g
Acqua distillata	20 mL

Il supplemento si trova in commercio in fiale. Nella preparazione, seguire le istruzioni della ditta produttrice. Aggiungere la Fenoltaleina difosfato all'acqua distillata e sterilizzare filtrando con una membrana di porosità nominale 0,2 µm. Prima dell'utilizzo leggere attentamente la scheda di sicurezza del prodotto e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

5.3.7. Membrane *Clostridium perfringens* Agar (mPC Agar)

Composizione	
Triptosio	30 g
Estratto di lievito	20 g
Glucosio	5 g
Magnesio solfato eptaidrato	0,1 g
Cloruro ferrico esaidrato	0,09 g
L-cisteina idrocloridrato	1 g
Indoxil-β-glucoside	0,06 g
Bromocresolo porpora	0,04 g
Agar	15 g
Acqua distillata	970 mL

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

Sospendere gli ingredienti in 970 mL di acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa dissoluzione. Sterilizzare a $(121\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Raffreddare a 50°C ed aggiungere 10 mL della soluzione di Polimixina β solfato e D-Cicloserina (5.3.5.), e 20 mL della soluzione di Fenoltaleina difosfato (5.3.6.). Se necessario aggiustare il pH a $7,6\pm 0,2$. Distribuire in piastre.

Conservare a $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

5.3.8. Ammonio idrossido

Il prodotto si trova disponibile in commercio. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e va utilizzato esclusivamente sotto cappa chimica. Prima dell'utilizzo leggere attentamente la scheda di sicurezza del prodotto e utilizzare dispositivi di protezione individuale.

5.4. Procedura

5.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Pesare un sub-campione rappresentativo di 25 g in peso umido in un contenitore da 250 mL. Aggiungere soluzione di Ringer (1/4 X) (5.3.1.) in volume appropriato in modo che il peso finale sia pari a 250 g, miscelare nuovamente mediante agitatore vortex e omogeneizzare preferibilmente tramite un sonicatore, o utilizzando un omogeneizzatore tradizionale che permetta una adeguata sospensione del campione.

Nell'eventualità si utilizzi un omogeneizzatore tradizionale, tipo stomacher, porre il campione miscelato nel sacchetto appropriato e omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità.

Utilizzare sacchetti provvisti di rete all'interno per omogeneizzare campioni con contenuto solido secco $>20\%$, mentre sacchetti privi di rete interna possono essere impiegati per i campioni con contenuto solido secco $<20\%$. La procedura permette la disaggregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

I campioni da analizzare possono contenere quantità variabili di materiale solido; pertanto, alcuni di essi potranno richiedere una fase di centrifugazione e di prefiltrazione prima di essere analizzati per filtrazione. In questo caso, trasferire tutto il contenuto del sacchetto in tubi conici sterili da centrifuga e centrifugare le aliquote per 3 minuti, impostando una velocità di 200÷300 g/minuto.

Decantare in un beaker il supernatante ed eventualmente filtrare attraverso un pre-filtro in fibra di vetro di diametro di 47 mm a porosità nominale di 2,7 µm per rimuovere i detriti più fini. Per evitare intasamenti, versare il campione nell'imbuto da filtrazione gradualmente. Una volta terminata la prefiltrazione, trasferire il filtrato in un contenitore sterile.

Per matrici trattate con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ agitando con cura per assicurarne un'omogeneizzazione completa. Se, durante la neutralizzazione, il pH scende sotto il valore di 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

5.4.2. Pretrattamento del campione

La procedura permette di distruggere le forme microbiche vegetative attivando contemporaneamente la germinazione delle forme sporali.

Prelevare un volume della sospensione primaria (5.4.1.) adeguato allo svolgimento delle successive diluizioni e analisi. Trasferirlo in un contenitore appropriato provvisto di chiusura ermetica e porlo in acqua fredda. Riscaldare a $(75 \pm 5)^\circ\text{C}$ per 15 minuti, provvedendo che la temperatura si mantenga costante; il progressivo riscaldamento innesca il meccanismo di germinazione delle spore. Dopo tale periodo raffreddare tempestivamente sotto acqua fredda prima di procedere alle analisi.

5.4.3. Preparazione delle diluizioni dalla sospensione primaria

Il numero di diluizioni da filtrare successivamente varia in funzione della concentrazione stimata di spore di *C. perfringens* presenti nel campione.

La sospensione primaria dopo il pretrattamento dovrebbe essere ulteriormente diluita in diluizioni seriali da 10^{-1} a 10^{-3} con soluzione di Ringer (1/4 X) (5.3.1.). Campioni con maggiori concentrazioni di batteri richiederanno diluizioni addizionali della sospensione primaria fino a 10^{-4} ÷ 10^{-5} .

Preparare un quantitativo di provette sterili in base al numero delle diluizioni da effettuare e dispensare in ciascuna di esse 9 mL di soluzione di Ringer (1/4 X) (5.3.1.).

Mediante una pipetta sterile trasferire 1 mL della sospensione primaria pretrattata nella prima provetta contenente i 9 mL di soluzione di Ringer (1/4 X) e mescolare con agitatore tipo vortex. Procedere in modo analogo per la preparazione delle altre diluizioni.

5.4.4. Isolamento

Aggiungere nel bicchiere filtrante un quantitativo sufficiente di soluzione di Ringer (1/4 X) (5.3.1.) sterile (15 o 20 mL), aggiungere quindi 1 mL della sospensione primaria trattata. Filtrare il campione attraverso una membrana quadrettata sterile di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro con porosità nominale di 0,45 µm. Mediante pinzette sterili rimuovere la membrana e trasferirla nella capsula contenente il terreno mTSC agar (5.3.4.). Ripetere l'operazione per le diluizioni preparate. Come di norma, poggiare la membrana con un movimento rotatorio per prevenire la formazione di bolle di aria. Membrane raggrinzite, strappate o danneggiate, devono essere scartate.

Prima di procedere alla filtrazione della prima diluizione aggiungere un controllo negativo costituito da 1 mL di soluzione di Ringer (1/4 X) sterile. Dopo la filtrazione dell'ultima diluizione, aggiungere un controllo negativo (1 mL di soluzione di Ringer (1/4 X) sterile) e un controllo positivo (sospensione di un ceppo certificato di *C. perfringens* contenente 10^2 - 10^3 microrganismi/mL).

5.4.5. Incubazione e conteggio delle colonie su substrato selettivo

Incubare le piastre alla temperatura di $(44\pm 1)^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore in condizioni di anaerobiosi, utilizzando apposita giara per anaerobiosi o incubatore per anaerobiosi.

Ridurre al minimo il tempo tra l'analisi e l'incubazione delle piastre seminate.

I microrganismi appartenenti alla specie *C. perfringens*, sul terreno mTSC agar, formano colonie nere o grigio/giallo-marrone che danno colorazione anche debolmente scura sopra o sotto la membrana filtrante. Contare le colonie tipiche e che esibiscono fluorescenza azzurra alla luce ultravioletta e considerarle come *C. perfringens* presuntivo. Per una stima ottimale dovranno essere prese in considerazione soltanto le piastre con intervallo di crescita 10-100 colonie.

Se nessuno dei conteggi ottenuti rientra nell'intervallo sarebbe opportuno considerare conte al di fuori di esso a patto che sia possibile una quantificazione accurata.

5.4.6. Conferma delle colonie

Trasferire asepticamente la membrana mediante pinzette sterili su una piastra contenente mPC Agar (5.3.7.) ed incubare alla temperatura di $(44\pm 1)^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 ore in condizioni di anaerobiosi. Dopo incubazione contare il numero delle colonie gialle presenti sulla membrana e trasferire la membrana su un *pad* imbibito con poche gocce (3-5) di ammonio idrossido (5.3.8.), effettuare l'operazione sotto cappa chimica. Contare come *C. perfringens* confermate le colonie che, esposte ai vapori dell'ammonio idrossido, virano la colorazione dal giallo al rosa entro 3 minuti.

5.4.7. Determinazione del peso secco

Il numero di spore di *C. perfringens* può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente con le analisi microbiologiche.

5.5. Espressione dei risultati

Per calcolare la concentrazione di *C. perfringens* in 1 g di campione originale umido o in 1 g di campione secco deve essere preso in considerazione il numero delle colonie confermate su mPC agar, e le relative diluizioni. Il calcolo prende in considerazione il volume e le diluizioni filtrate e, per il numero di *C. perfringens* per g di campione secco, il contenuto percentuale di sostanza secca.

Calcolare il numero di colonie per g di peso umido in base alla seguente formula:

$$C_u = n/abv$$

dove:

- C_u è la concentrazione di *C. perfringens* espressa come numero per grammo di peso umido;
- n è il numero totale di colonie tipiche confermate contate nelle diluizioni selezionate;

- a è il fattore iniziale di diluizione della sospensione primaria;
- b è il fattore di diluizione delle diluizioni seriali selezionate;
- v è il volume totale filtrato attraverso le membrane delle diluizioni selezionate.

Di seguito viene presentato un esempio di calcolo.

Se il volume filtrato delle diluizioni è pari a 1 mL e due delle suddette diluizioni producono conte che rientrano nell'intervallo 10-100:

Diluizione	Conte
10^{-2}	81 colonie
10^{-3}	15 colonie

si ottiene:

n = numero di colonie ($81+15 = 96$);

a = fattore iniziale di diluizione (10^{-1});

b = fattore di diluizione delle diluizioni selezionate (10^{-2} e 10^{-3});

v = volume filtrato (1 mL);

$C_u = 96 / (0,1 \times 0,01 \times 1) + (0,1 \times 0,001 \times 1) = 96 / 0,0011 = 8,7 \times 10^4$

Il valore ottenuto è la concentrazione di *C. perfringens* per g di peso umido del campione originale (UFC/g di peso umido).

Il numero di colonie per g di peso secco del campione è calcolato, invece, in base alla formula:

$$C_s = C_u \times 100/e$$

dove:

e = residuo secco percentuale del campione umido originale (UFC/g di peso secco).

6. Metodo ISS F 004C rev.00

6.1. Principio del metodo

Tecnica della conta del valore dell'MPN. Si basa sulla capacità di *C. perfringens* di metabolizzare il 4-metilumbelliferil fosfato (MUP) usando l'enzima acido fosfatasi per produrre 4-metilumbelliferone che fluoresce quando esposto a luce ultravioletta alla lunghezza d'onda di 366 nm.

I campioni omogeneizzati e diluiti vengono inoculati in un brodo selettivo e quindi incubati a $(43 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 22 ± 2 ore. La presenza del batterio è evidenziata da fluorescenza sotto la luce ultravioletta.

6.2. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio (Appendice A) è necessario avere a disposizione una lampada di Wood a 366 nm.

6.3. Reagenti, diluenti e terreni colturali

Per assicurare risultati riproducibili, preparare terreni colturali e diluenti usando sia costituenti di qualità uniforme sia prodotti chimici di riconosciuto grado analitico, oppure utilizzare diluenti disidratati o terreni completi preparati seguendo le istruzioni della ditta produttrice.

L'acqua utilizzata deve essere demineralizzata o distillata, priva di sostanze che, in condizioni standard, potrebbero inibire la crescita microbica.

6.3.1. Soluzione fisiologica tamponata

Composizione	
Sodio cloruro	8,5 g
Potassio fosfato bibasico	1 g
Potassio fosfato monobasico	3 g
Acqua distillata	1000 mL

La soluzione si prepara a partire dai singoli ingredienti. Aggiungere i vari componenti all'acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa dissoluzione. Se necessario aggiustare il pH a $7,2 \pm 0,2$.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare la soluzione a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese.

6.3.2. Soluzione di Ringer (1/4 X)

Composizione	
Sodio cloruro	2,25 g
Potassio cloruro	0,11 g
Calcio cloruro esaidrato	0,12 g
Sodio bicarbonato	0,05 g
Acqua distillata	1000 mL

La soluzione si può preparare a partire dai singoli ingredienti, ma sono anche disponibili in commercio compresse a concentrazione idonea. Aggiungere gli ingredienti ad acqua distillata, riscaldare fino a ebollizione agitando frequentemente per ottenerne la completa dissoluzione. Se necessario, aggiustare il pH della soluzione a $7,0 \pm 0,2$.

Distribuire in tubi o beute e sterilizzare a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Conservare la soluzione a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ per non più di due settimane.

6.3.3. Metilumbelliferilfosfato sale bisodico (MUP)

Composizione	
4-metilumbelliferilfosfato sale bisodico (MUP)	100 mg
Acqua distillata	5 mL

Il supplemento si trova in commercio in fiale. Nella preparazione, seguire le istruzioni della ditta produttrice. Aggiungere il MUP all'acqua distillata e sterilizzare filtrando con una membrana di porosità nominale $0,2 \mu\text{m}$.

6.3.4. D-Cicloserina

Composizione	
D-cicloserina	400 mg
Acqua distillata	5 mL

Il supplemento si trova in commercio in fiale. Nella preparazione, seguire le istruzioni della ditta produttrice. Aggiungere la D-cicloserina all'acqua distillata e sterilizzare filtrando con una membrana di porosità nominale 0,2 µm.

6.3.5. Brodo alla cicloserina triptosio solfato modificato completo (mTSCB)

Composizione	
Triptosio	15 g
Estratto di carne	5 g
Peptone di soia	10 g
Estratto di lievito	5 g
Sodio acetato	5 g
L-cisteina idrocloridrato	2 g
Acqua distillata	1000 mL

Aggiungere i reagenti ad 1 L di acqua distillata e scaldare fino ad ebollizione. Se necessario aggiustare il pH $7,2 \pm 0,2$. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti. Raffreddare alla temperatura di 50°C e aggiungere rispettivamente 2,5 mL della soluzione D-cicloserina (6.3.4.) e 2,5 mL della soluzione MUP (6.3.3.). Distribuire in tubi sterili il brodo con i supplementi in ragione di 9 mL/tubo.

6.4. Procedura

6.4.1. Preparazione della sospensione primaria

Sospendere un sub-campione rappresentativo di 25 g (in peso umido) in un appropriato volume di soluzione fisiologica tamponata (6.3.1.) o della soluzione di Ringer (1/4 X) (6.3.2.) per raggiungere un volume finale di 250 mL. Omogeneizzare utilizzando preferibilmente un sonicatore, o utilizzando un omogeneizzatore tradizionale che permetta una adeguata sospensione del campione.

Nell'eventualità si utilizzi un omogeneizzatore tradizionale, tipo stomacher, omogeneizzare per 2 minuti a bassa velocità e procedere immediatamente all'analisi. La procedura permette la disgregazione delle particelle del campione con conseguente rilascio dei microrganismi in esse aggregati e separazione dei cluster microbici.

Per matrici trattate con calce, portare il pH a $7,0 \pm 0,5$ agitando il campione per assicurare un'omogeneizzazione completa. Se durante la neutralizzazione il pH scende sotto il valore 4,5, iniziare una nuova analisi con una nuova aliquota di campione. Per neutralizzare altri agenti disinfettanti usati nel trattamento dei fanghi (es. acido peracetico), utilizzare appropriati neutralizzanti.

6.4.2. Pretrattamento del campione

La procedura permette di distruggere le forme microbiche vegetative attivando contemporaneamente la germinazione delle forme sporali.

Prelevare un volume della sospensione primaria (6.4.1.) adeguato allo svolgimento delle successive diluizioni e analisi. Trasferirlo in un contenitore appropriato provvisto di chiusura ermetica e porlo in acqua fredda. Riscaldare a $(75\pm 5)^\circ\text{C}$ per 15 minuti, provvedendo che la temperatura si mantenga costante; il progressivo riscaldamento innesca il meccanismo di germinazione delle spore. Dopo tale periodo raffreddare tempestivamente sotto acqua fredda prima di procedere alle analisi.

6.4.3. Preparazione delle diluizioni dalla sospensione primaria

Il numero delle diluizioni del campione da filtrare successivamente varia in funzione della concentrazione stimata di spore di *C. perfringens* presenti nel campione. Solitamente, la sospensione primaria sottoposta a pretrattamento dovrebbe essere diluita in modo decimale da 10^{-1} a 10^{-3} con soluzione fisiologica tamponata (6.3.1.) o della soluzione di Ringer (1/4 X) (6.3.2.). Livelli di contaminazione maggiori richiederanno ulteriori diluizioni (fino a 10^{-4} - 10^{-6}).

Preparare un numero adatto di contenitori sterili a seconda del numero di diluizioni selezionate e asepticamente dispensare 9 mL di soluzione fisiologica tamponata (6.3.1.) o della soluzione di Ringer (1/4 X) (6.3.2.) in ciascun contenitore.

Usando una pipetta sterile, trasferire 1 mL della sospensione primaria pretrattata al calore nei 9 mL di soluzione fisiologica tamponata, o della soluzione di Ringer (1/4 X), quindi miscelare in modo accurato utilizzando un agitatore tipo vortex per 5-10 secondi.

Procedere come sopra descritto per preparare tutte le diluizioni necessarie.

6.4.4. Inoculo in brodo (nei tubi)

Inoculare 1 mL della sospensione primaria (6.4.1.) in 3 tubi contenenti 9 mL di mTSCB (6.3.5.).

Da ciascuna diluizione (es. 10^{-1} - 10^{-3}) prelevare 1 mL e trasferirlo in ciascuno dei 3 tubi contenenti 9 mL di mTSCB in modo da ottenere per ogni diluizione, una tripletta di tubi. In caso di diluizioni ulteriori, seminare un numero proporzionale di triplette.

6.4.5. Rivitalizzazione e conta dei tubi positivi in brodo selettivo

Incubare i tubi inoculati in condizioni di anaerobiosi alla temperatura di $(44\pm 1)^\circ\text{C}$ per 22 ± 2 ore, mediante apposita giara per anaerobiosi, incubatore per anaerobiosi oppure coprendo la superficie del brodo con uno strato di olio minerale sterile. Osservare l'avvenuta reazione positiva che è data dall'emissione, nel brodo, di una fluorescenza blu alla luce ultravioletta. Se, dopo l'incubazione iniziale, i tubi non presentano tale reazione reincubarli per ulteriori 44 ± 2 ore. Se anche dopo tale periodo la reazione non si presenta, i tubi vanno considerati come negativi per la crescita di *C. perfringens*.

6.4.6. Conferma

Il brodo alla Cicloserina Triptosio Solfato modificato fornisce risultati confermati per *C. perfringens* per la presenza del MUP.

6.4.7. Determinazione del peso secco

Il numero di spore di *C. perfringens* può essere calcolato sia per peso umido che per peso secco; per quest'ultimo è necessario effettuare la determinazione del residuo secco del campione secondo la norma UNI EN 12880; tale determinazione può essere eseguita contemporaneamente con le analisi microbiologiche.

6.5. Espressione dei risultati

C. perfringens è presente nel campione esaminato se i tubi di brodo alla Cicloserina Triptosio Solfato modificato sottoposti a luce ultravioletta risultano fluorescenti. Per ogni diluizione annotare il numero di tubi positivi.

Identificare il numero caratteristico (NC) corrispondente al numero di tubi positivi delle tre ultime diluizioni che danno un numero > 0.

Sulla base della tabella in Appendice B (Tabella B2), calcolare il valore MPN che corrisponde al numero caratteristico ottenuto. Il risultato equivale al numero MPN per mL della sospensione primaria preparata.

Per calcolare il numero di spore nel campione originale (peso umido) è necessario tenere in considerazione il fattore di diluizione.

Di seguito viene riportato un esempio di calcolo.

$$NC = 3/1/0$$

Valore corrispondente MPN/mL = 4,3

Diluizione corrispondente utilizzata = 10^{-3}

MPN/g = $(4,3/10^{-3}) \times 250\text{g}/25\text{g} = 43000/\text{g}$ di peso umido

Per calcolare il contenuto di peso secco, utilizzare la seguente formula:

$$N_s = N_u \times 100/e$$

dove:

N_s = conteggio in MPN per grammo di peso secco

N_u = conteggio in MPN di *Clostridium perfringens*/g di peso umido

e = % di massa secca del campione originale umido

Bibliografia

- Adcock AW, Saint CP. Rapid confirmation of *Clostridium perfringens* by using Chromogenic and Fluorogenic substrates. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(9):4382-4.
- Bonadonna L, Briancesco R, Marini R. *Clostridium perfringens* come indicatore di contaminazione ambientale e suo significato sanitario. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2002. (Rapporti ISTISAN 02/8).
- Bonadonna L. Analisi di spore di clostridi solfito-riduttori. In: *Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino costiero*. Roma: Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio – Servizio Difesa Mare; 2001.
- Davies CM, Long JA, Donald M, Ashbolt NJ. Survival of fecal microorganisms in aquatic sediments of Sydney, Australia. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1888-96.
- De Man JC. MPN tables, corrected. *Eur J Appl Microbiol* 1983;17:301-5.
- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR Jr, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC Jr. *Testo atlante di microbiologia diagnostica*. 2ª ed. Roma: Delfino Editore; 1995.
- UNI EN 12880. *Caratterizzazione dei fanghi - Determinazione del residuo secco e dell'umidità*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.

MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

0. Considerazioni generali

Il campionamento di fanghi di depurazione e altri fanghi trattati e non trattati, ammendanti organici, suoli anche concimati, sedimenti e matrici assimilabili rappresenta una fase fondamentale e indispensabile per lo sviluppo delle successive procedure analitiche.

È importante che il campione raccolto sia quanto più possibile rappresentativo per ottenere dati affidabili e utili alla individuazione delle caratteristiche di qualità della matrice da esaminare.

Per procedere al prelievo, al trasporto e alle analisi dei campioni per l'esame microbiologico è richiesta l'adozione di diverse precauzioni relative sia alla raccolta del campione che alla protezione di coloro che manipolano il campione stesso.

È necessario condurre i prelievi secondo procedure che garantiscano che i campioni non vengano contaminati e non ne venga quindi alterata la qualità originaria, fermo restando l'adozione di adeguate norme di sicurezza da parte del personale addetto allo svolgimento di tali operazioni. È pertanto fondamentale che durante le procedure di campionamento per l'analisi microbiologica vengano utilizzati recipienti o sacchi puliti, chiusi accuratamente per il trasporto del materiale al laboratorio per l'analisi.

Il campione prelevato deve essere accompagnato da tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione e deve essere trasmessa, con il campione, qualunque altra osservazione possa risultare utile nella interpretazione dei risultati di laboratorio.

Prima di procedere al prelievo dei campioni, è utile effettuare un'ispezione preliminare allo scopo di verificare lo stato della massa da campionare e le modalità di esecuzione dell'operazione.

Al fine di ottenere un campione il più statisticamente rappresentativo, oltre che raccogliere dati sulla tipologia delle matrici negli impianti di produzione e/o trattamento, come nel caso di fanghi e ammendanti organici, o in campo, come nel caso di suoli, suoli concimati e sedimenti, occorre ridurre il più possibile l'effetto che l'eterogeneità della matrice può determinare sulla variabilità del dato analitico.

1. Termini e definizioni

Pertanto, la procedura di campionamento, di ogni matrice considerata, deve necessariamente tenere conto dei concetti riassunti nelle seguenti definizioni:

- *Campione elementare*: quantità di materiale proveniente da ogni singolo prelievo dal lotto o partita in esame.
- *Campione globale, composito o medio*: quantità di materiale ottenuta dal rimescolamento di tutti i campioni singoli o elementari.
- *Campione finale o ridotto*: parte rappresentativa del campione globale, ottenuta mediante eventuale riduzione della quantità di quest'ultimo.
- *Aliquota*: parte in cui è suddiviso il campione di peso e volume omogeneo.
- *Frazione*: parte in cui può essere suddivisa una aliquota allo scopo di consentire l'analisi da parte di diversi laboratori.

- *Zona di campionamento*: area sottoposta al campionamento. Una zona di campionamento è suddivisa in più unità di campionamento.
- *Unità di campionamento*: estensione definita di una matrice, dotata di limiti fisici o ipotetici.

2. Confezionamento e trasporto dei campioni

Il campione finale sarà suddiviso e introdotto in contenitori di capacità adeguata in plastica, vetro o sacchetti sterili per alimenti. Tutte le aliquote o frazioni in cui è stato suddiviso il campione, nel numero necessario per i laboratori che devono eseguire l'analisi, devono essere sigillati e contrassegnati.

Poiché l'inosservanza dei tempi e/o delle modalità di trasporto può comportare alterazioni della composizione del campione, è necessario procedere al trasporto in modo che nel campione da analizzare la flora batterica presente non subisca riduzioni o incrementi o che si verifichi il fenomeno di ricrescita (1, 2). Pertanto, durante il trasporto, effettuato nel più breve tempo possibile, è necessario mantenere i campioni al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra $(4\pm 10)^{\circ}\text{C}$.

Per il mantenimento della temperatura richiesta può essere necessario l'impiego di frigoriferi portatili o altrimenti contenitori termoisolanti (borse termiche) utilizzando le apposite piastre refrigeranti disponibili in commercio.

È da ricordare che per i campioni da analizzare dal punto di vista microbiologico, è assolutamente da evitare il congelamento.

È preferibile effettuare l'analisi entro 24 ore dal momento del prelievo mantenendo, fino al momento dell'esame microbiologico, i campioni a circa $+ 4^{\circ}\text{C}$ effettuando, comunque, l'analisi sulle matrici a temperatura ambiente.

2.1. Verbale di campionamento ed etichettatura delle eventuali aliquote e del campione finale

Il verbale di campionamento deve essere redatto utilizzando un apposito modulo o scheda di campionamento compilando tutte le parti in esso previste e descrivendo le modalità con cui è stato eseguito il prelievo e costituito il campione composito o le diverse aliquote per l'invio al laboratorio.

Le diverse aliquote o frazioni in cui è stato eventualmente suddiviso il campione devono essere contrassegnate con etichetta che riporti il numero progressivo corrispondente al numero riportato in ciascun verbale di campionamento. A ciascuna aliquota o frazione verrà attribuito oltre al numero del campione una lettera progressiva per le aliquote e un numero progressivo per le frazioni.

Copia del verbale deve accompagnare, pertanto, anche ciascuna aliquota o frazione in cui è suddiviso il campione.

2.2. Attrezzature

Gli strumenti necessari per il campionamento devono essere costruiti con materiali e modalità che non possano influenzare le caratteristiche microbiologiche, e generali, la matrice che si vogliono determinare.

Sono generalmente necessari:

- pala o badile;
- sonda o trivella;
- vanga;
- coltello robusto;
- telo di plastica monouso asciutto e pulito di circa 2 m²;
- secchio o vaschette capienti in materiale inerte (plastica o vetro), con volume non inferiore a 10 litri;
- setacci a 2 mm e a 5 mm;
- guanti lattice o nitrile usa e getta;
- contenitori in plastica/vetro o sacchetti sterili della capacità minima pari a 250 g;
- lacci per sigillare;
- flambatore portatile;
- borsa termica con piastre refrigeranti;
- etichette adesive e pennarelli indelebili per tutte le superfici;
- contenitori di capacità di almeno un litro, dotati di adeguato sistema di chiusura.

2.3. Modalità operative generali

Per lo svolgimento del campionamento, le operazioni in successione dovrebbero prevedere quanto di seguito elencato.

Stendere a terra il telo di plastica per evitare che il materiale da prelevare venga a contatto con una diversa superficie. Successivamente:

- individuare possibilmente più punti di prelievo da cui prelevare aliquote per totalizzare il campione composito in quantità pari a 1 Kg;
- per ogni punto individuato scartare lo strato superficiale di circa 10 cm, prelevare quindi un sub-campione di materiale fino alla profondità massima di 30 cm;
- flambare la pala/badile, e lasciare raffreddare, ogni volta che si preleva il materiale;
- adagiare i sub campioni sul telo, miscelare i campioni elementari prelevati dai punti individuati precedentemente;
- prelevare dal mix dei campioni elementari (campione composito) circa 1 Kg di materiale e riempire un numero adeguato di sacchetti sterili;
- apporre un'etichetta adesiva sul contenitore/sacchetto per identificare il campione;
- collocare i contenitori/sacchetti con il campione da analizzare nella borsa termica con le piastre refrigeranti per il trasporto e durante tutto il tempo che precede la spedizione, avendo cura di non far aderire le barrette refrigeranti al campione stesso.

Di seguito vengono riportate le modalità di campionamento per differenti matrici quali: fanghi di depurazione, trattati e non trattati, ammendanti organici, suoli e sedimenti.

Ancorché le procedure siano specifiche e idonee per le varie matrici di interesse, sono comunque indicative. Possono essere quindi utilizzati criteri diversi sulla base dell'esperienza e della tipologia specifica di ciascuna matrice.

3. Fanghi

Il campionamento di questa matrice consiste nel prelievo di una o più aliquote di fango di depurazione in uscita dalla linea fanghi di un impianto autorizzato al trattamento delle acque reflue.

Data la peculiare natura della matrice, le modalità di campionamento devono tenere conto della natura e pezzatura del materiale, del tipo di giacitura del materiale (cumuli, vasche, container, ecc.), della tecnica di produzione (se a ciclo continuo o discontinuo).

I punti di campionamento dovranno, pertanto, essere tanto più numerosi quanto più elevata è l'eterogeneità del materiale.

Il prelievo deve interessare tutta la massa nel suo complesso: zone interne, intermedie ed esterne (ad esclusione dei 10 cm dello strato superficiale soprattutto in caso di materiali in condizioni di giacenza da parecchi giorni).

Prima di iniziare le operazioni di prelievo è necessario considerare, pertanto, l'entità della massa da campionare in relazione al tempo di produzione, le condizioni di conservazione e giacenza del materiale (in cumuli, container per materiali in stoccaggio o scarico da un nastro trasportatore) e le dimensioni delle particelle elementari che compongono il fango stesso (aspetto particolarmente importante nel caso di materiali molto disomogenei).

3.1. Campionamento da cumuli o container

Effettuare il campionamento su una massa costituita necessariamente da materiale di età non superiore a 15 giorni in termini di tempo trascorso dall'uscita dall'impianto di pressatura.

In relazione al volume della massa in esame, si consiglia il prelievo di almeno 12 campioni elementari ogni 200 m³ tenendo presente che ogni campione elementare deve essere pari ad almeno 1 kg. Pertanto, dopo aver circoscritto la massa, individuare almeno 3 diverse sezioni equidistanti tra loro e, in corrispondenza di ogni posizione, prelevare almeno 4 campioni a due altezze e due profondità.

Nel caso di cumuli di grosse dimensioni è consigliabile effettuare un'accurata miscelazione con pala meccanica prima di procedere al prelievo dei campioni elementari, soprattutto nel caso in cui il perimetro del cumulo non sia completamente accessibile.

Il campione composito, generato dalla miscelazione dei 12 campioni elementari, deve essere ulteriormente e accuratamente rimescolato su una superficie dura e pulita. Si procede quindi al rivoltamento per formare un cono e si ripete l'operazione per 3 volte. Il cono viene quindi suddiviso, in modo il più possibile omogeneo, in quarti; due quarti diametralmente opposti vengono conservati e riuniti mentre gli altri due vengono scartati. Si ripete l'operazione fino a quando gli ultimi due quarti producono la massa di campione richiesta pari ad almeno 1 kg.

3.2. Campionamento da sistemi chiusi e impianti a ciclo continuo e discontinuo

Nel caso di impianti di trattamento che non prevedono lo stoccaggio finale dei fanghi, il campionamento va eseguito all'atto dello scarico, che può essere continuo o discontinuo.

Campioni elementari prelevati durante le operazioni di scarico che dovranno costituire il campione composito, dovranno essere, fino ad allora, adeguatamente conservati.

Se il campionamento viene eseguito sul lotto giornaliero scaricato già messo a parco, i campioni elementari devono essere prelevati con lo stesso criterio indicato per il prelievo in cumuli e container.

In alternativa, può essere prelevata una quota significativa di materiale da una intera sezione verticale al centro della porzione scaricata (cumulo a sezione troncoconica) da cui prelevare poi i campioni elementari.

Si consiglia il prelievo di almeno 1 campione elementare ogni 10 m³ di materiale.

4. Ammendanti organici

Il campionamento degli ammendanti organici, in particolar modo dell'ammendante compostato, presenti negli impianti finalizzati può essere condotto sui prodotti già confezionati o sui prodotti ancora sfusi e in cumuli.

Per eseguire il campionamento di prodotti confezionati bisogna tenere conto del numero di imballaggi della partita da cui si consiglia prelevare il seguente numero di campioni elementari:

- meno di 5 confezioni: tutti;
- da 5 a 16: 4;
- da 17 a 400: $\sqrt{n^\circ}$ confezioni costituenti la partita;
- più di 400: 20.

Dalla totalità dei campioni elementari ottenuti, prelevare tre sub-campioni da almeno 1 kg ciascuno da cui ricavare, previa accurata miscelazione, il campione composito finale su cui effettuare le determinazioni microbiologiche.

Il campionamento del prodotto sfuso deve interessare tutta la massa nel suo complesso: zone interne, intermedie ed esterne, ad esclusione dei 10 cm dello strato superficiale. Il prelievo va effettuato direttamente dal cumulo nel quale devono essere individuate almeno 3 sezioni equidistanti tra loro lungo la linea mediana o lungo il perimetro del cumulo stesso. In corrispondenza di ogni posizione è consigliabile prelevare almeno 4 campioni elementari a due altezze e due profondità verso il cuore del cumulo 'precisamente a un terzo e a due terzi dell'altezza del cumulo e alla profondità di 30-50 cm e oltre 1,0 m, rispettivamente. Ogni campione elementare deve essere di almeno 1 kg. Il numero minimo di campioni elementari prelevati dovrebbe pertanto essere pari a 12. In relazione al volume del lotto in esame, si consiglia il prelievo di almeno 12 campioni elementari ogni 200÷300 m³.

Nel caso di cumuli di grosse dimensioni è consigliabile effettuare un'accurata miscelazione con pala meccanica prima di procedere al prelievo dei campioni elementari, soprattutto nel caso in cui il perimetro del cumulo non sia completamente accessibile. È comunque opportuno prelevare un numero di campioni elementari prelevati da zone diverse del cumulo, in relazione soprattutto alla giacenza temporale tra il primo prodotto ottenuto, a valle della fase di maturazione, e l'ultimo stoccato.

Il campione, costituito da almeno 12 kg di materiale deve essere ripetutamente e accuratamente mescolato su una superficie dura e pulita, mediante idonea strumentazione, evitando contaminazioni secondarie.

Si procede quindi all'omogeneizzazione per rivoltamento per formare un cono e si ripete tale operazione per 3 volte. Il cono viene quindi suddiviso, in modo il più possibile omogeneo, in quarti; due quarti diametralmente opposti vengono conservati e riuniti mentre gli altri due vengono scartati. Tale manovra viene ripetuta fino a quando gli ultimi due quarti producono la massa di campione richiesta, pari ad almeno 1 kg.

5. Suoli

Relativamente alla matrice suolo, è noto quanto i microrganismi in essa presenti rispondano tempestivamente a tutte le variazioni di temperatura e umidità; pertanto le analisi microbiologiche devono essere il più possibile espletate nelle condizioni più vicine a quelle in cui il suolo si trova prima di venire campionato.

La modalità di campionamento finalizzato all'analisi microbiologica può comunque essere espletata secondo quanto disciplinato e previsto dal DM n. 010175 dell'8 luglio 2002

“Approvazione e ufficializzazione dei metodi di analisi microbiologica” e dal DM del 13 settembre 1999 “Approvazione dei metodi ufficiali di analisi chimica del suolo” - allegato 1, che regolamentano il controllo della qualità dei suoli agrari, forestali, a prato naturale e a pascolo. La scelta della modalità di campionamento, la localizzazione e il numero dei prelevamenti devono essere in relazione con le finalità dell'indagine e con il grado di dettaglio che si intende raggiungere.

Affinché i metodi di analisi, diretti a determinare una eventuale contaminazione e/o attività microbica del suolo, risultino di diffusa e generalizzata applicabilità è importante poter disporre di metodi standard di campionamento, trattamento e conservazione dei campioni che risultino di semplice esecuzione e di comprovata efficacia.

È necessario inoltre considerare la variabilità dei suoli, dovuta a cause naturali o antropiche.

I suoli hanno caratteristiche relativamente costanti nel tempo, quali la natura, lo spessore e la distribuzione degli orizzonti, e caratteristiche che variano con le stagioni in dipendenza, ad esempio, del livello delle falde acquifere, con le colture (in relazione alle lavorazioni, alla fertilizzazione, ecc.), e a seguito di particolari eventi (movimenti di terra, smottamenti, sommersioni).

Il campionamento consisterà quindi nell'esecuzione di una serie di prelievi elementari di materiale terroso in una zona presunta omogenea, ad una profondità predeterminata, per costituire uno o più campioni per il laboratorio, rappresentativi del livello medio e/o della variabilità delle caratteristiche che si intendono esaminare. In presenza di una possibile disomogeneità, o di particolari e puntiformi contaminazioni, è comunque più opportuno analizzare singolarmente i diversi prelievi, evitando i campioni medi ed effettuare i prelevamenti preferibilmente in luoghi significativi del fenomeno da indagare.

Pertanto, è opportuno individuare la zona di campionamento, eventualmente con il concorso di persone esperte dello specifico territorio, delimitando un'area nella quale il colore, l'aspetto fisico, l'ordinamento colturale, le fertilizzazioni ricevute in passato e la vegetazione coltivata e/o spontanea, risultino abbastanza omogenee.

Nel caso si disponga di una carta dei suoli, individuare la zona di campionamento all'interno di una sola unità pedologica e georeferenziare i punti di prelievo prescelti, evitando di effettuare i prelevamenti in prossimità dei bordi dell'unità pedologica.

Queste operazioni potranno portare alla suddivisione della zona da campionare in due o più unità di campionamento, ognuna delle quali presenti le caratteristiche di omogeneità sopra descritte. Il numero di unità di campionamento di ciascuna zona dovrà essere proporzionale all'area della superficie della stessa zona.

Perimetrare la zona da campionare e, qualunque sia l'estensione della superficie, raccogliere almeno 15 campioni elementari pari a 500 g ciascuno, prelevando non meno di 6 campioni per ettaro. Per aree molto estese mantenere separati i campioni raccolti.

Solitamente il prelievo di suolo destinato ad analisi microbiologiche deve essere eseguito alla profondità di 0-15 cm poiché, di norma, è questo lo strato di suolo maggiormente colonizzato dai microrganismi.

Tuttavia, a parità di tipo di suolo, un prato naturale polifita e un campo arato devono essere campionati in modo differente; nel primo si avrà in linea di massima una biomassa localizzata nei primi 5 cm di profondità, nel secondo sarà necessario campionare anche gli strati più profondi dato che nei suoli agrari i microrganismi risultano distribuiti piuttosto uniformemente lungo tutto il fronte dell'aratura (0-40 cm).

In caso si debbano indagare microrganismi anaerobi, che non necessitano di ossigeno né di luce e che pertanto possono colonizzare anche gli strati profondi del suolo, proibitivi per altre forme di vita microbica, il campionamento può essere effettuato anche a profondità maggiori.

Pertanto, nei suoli arativi soggetti a rovesciamento o rimescolamento, prelevare il campione alla massima profondità di lavorazione del suolo, distinguendo, eventualmente, lo strato immediatamente sottostante al limite di lavorazione da quello più profondo.

Nei suoli a prato naturale e a pascolo è necessario eliminare attentamente lo strato erboso, per poi campionare quello interessato dagli apparati radicali delle specie erbacee. In generale, per le analisi microbiologiche è comunque sufficiente campionare a profondità di 0-10 o 0-20 cm.

Nei suoli forestali prelevare più strati seguendo il profilo pedologico ed avendo particolare cura nel campionamento degli orizzonti organici ed eventualmente della lettiera, sia fresca che parzialmente decomposta. In genere, anche nel caso dei suoli forestali, essendo la biomassa microbica localizzata nei primi 0-10/0-20 cm di suolo, non è necessario spingersi con il campionamento molto oltre questa profondità, salvo particolari esigenze di studio. La raccolta di suolo va effettuata prelevando casualmente almeno tre campioni elementari all'interno di ogni unità di campionamento così ripartiti: a circa 1 metro di distanza da un tronco, ad una distanza intermedia tra due tronchi e, infine, in una zona coperta solo da fronde distanti dai tronchi.

Per tutte le tipologie di suolo è consigliabile prelevare un campione totale di almeno un chilogrammo, previa frantumazione delle zolle e setacciatura con maglie da 5 mm e da 2 mm, per allontanare i residui vegetali e lo scheletro.

Quando si deve operare su un campione fresco le condizioni di umidità del suolo possono rendere difficoltosa e lenta la setacciatura in tal caso l'operazione può essere velocizzata utilizzando direttamente le mani protette da guanti in gomma sterili.

La singola analisi viene poi condotta su di una quantità minore di suolo previo preliminare accurato rimescolamento dell'intero campione.

5.1. Campionamento

Il campionamento può essere effettuato secondo le diverse modalità previste dal campionamento sistematico, dal campionamento irregolare o casuale, dal campionamento non sistematico (a X o W), e dal campionamento a griglia circolare.

5.1.1. Campionamento sistematico

Il campionamento sistematico prevede di suddividere idealmente la zona di campionamento nel numero prescelto di unità di campionamento, utilizzando un reticolo di dimensioni opportune. Tutte le unità devono avere approssimativamente la stessa estensione. La dimensione della griglia dipende dal dettaglio che si intende raggiungere. All'interno di ogni unità di campionamento va prelevato casualmente un campione, evitando i bordi della zona di campionamento.

5.1.2. Campionamento irregolare

Il campionamento irregolare prevede che per la scelta dei punti di prelievo si utilizzino i numeri casuali riportati dai manuali di statistica; pertanto da ogni punto casuale verrà prelevato un campione elementare secondo gli stessi principi del campionamento sistematico.

5.1.3. Campionamento non sistematico

Il campionamento non sistematico (a X o a W) prevede che la scelta dei punti di prelievo venga effettuata lungo un percorso tracciato sulla superficie da investigare, formando una immaginaria lettera X o W. In ogni punto deve essere prelevato un campione elementare.

5.1.4. Campionamento a griglia circolare

Il campionamento a griglia circolare è una procedura particolarmente indicata per effettuare un'analisi di controllo finalizzata all'indagine degli effetti di una sorgente puntiforme di alterazione o inquinamento.

I prelievi vanno pertanto effettuati secondo lo schema di una griglia circolare, sulla quale i punti di raccolta del campione devono essere individuati all'intersezione di cerchi concentrici con le linee che uniscono i principali otto punti della circonferenza e ogni campione elementare prelevato costituisce, di per sé, un campione finale che deve essere analizzato singolarmente.

5.2. Modalità operative

Una volta individuato il sito di campionamento, eliminare, se necessario, la vegetazione che copre il suolo, introdurre verticalmente la sonda o la trivella fino alla profondità voluta ed estrarre il campione elementare di suolo.

Nel caso di suoli sabbiosi la sonda può essere introdotta nel suolo diagonalmente, ponendo attenzione a rispettare la profondità scelta.

Nel caso di suoli molto compatti che non permettono l'uso della sonda, scavare con la vanga una piccola buca a pareti verticali fino alla profondità prescelta.

Prelevare quindi una fetta verticale che interessi tutto lo strato.

Per ottenere il campione globale trasferire in un secchio di plastica i diversi campioni elementari, man mano che vengono prelevati.

Rovesciare quindi il secchio su un telo di plastica asciutto e pulito, disposto su una superficie piana e mescolare cercando di omogeneizzare accuratamente il materiale terroso raccolto.

Prelevare casualmente quindi, dal cumulo così omogeneizzato, una decina di sub campioni ciascuno di circa 50 g, distribuiti su tutta la superficie e che interessino tutto lo spessore del campione globale per costituire campione finale del peso pari a 500 g.

Trasferire il campione finale in un contenitore appropriato sterile, che non interagisca con il materiale terroso e sia impermeabile all'acqua e alla polvere. Possono essere utilizzati contenitori in plastica, vetro o sacchetti per gli alimenti.

Chiudere il contenitore e predisporre due etichette uguali nelle quali sia chiaramente identificato il campione.

Sulle etichette porre dei riferimenti biunivoci al verbale di campionamento.

Collegare un'etichetta al sistema di chiusura e attaccare l'altra alla superficie esterna del contenitore.

Non inserire mai le etichette all'interno del contenitore a contatto con il campione.

Verbalizzare informazioni precise sulla zona di campionamento, con opportuni riferimenti di georeferenziazione, catastali o geografici. Effettuare una descrizione di massima del suolo, dalla consistenza, colore, presenza e dimensioni di apparati radicali, alla vicinanza di centri abitati o insediamenti industriali e registrare il numero del campione, la località, la data, il nome dell'operatore, l'eventuale tipologia di copertura vegetale, l'uso del suolo, la tipologia di trattamenti subiti (nel caso di suolo agrario o rimboschito), la pendenza, l'esposizione e la profondità del prelievo.

6. Sedimenti

I sedimenti, di qualsiasi origine essi siano, possono svolgere un ruolo di trasporto diretto dei contaminanti e possono inoltre fungere loro da ricettacolo transitorio e definitivo. I livelli

sedimentari più superficiali sono sede di un complesso sistema ecologico utile per qualificare le condizioni ambientali di aree fluviali, lacustri, palustri, marine e costiere.

La caratterizzazione microbiologica dei sedimenti deve considerare lo strato più ricco di ossigeno e quindi il livello più superficiale di sedimento, qualora non debba essere indagata la componente anaerobica della flora microbica, a prescindere dalla tipologia di strumentazione utilizzata per il campionamento.

Il campionamento è soggetto a limitazioni fisiche determinate dalla profondità, dalle condizioni idrodinamiche, quali correnti e moto ondoso, e dalle caratteristiche tessiturali del sedimento stesso. Pertanto, il campionamento viene a fornire informazioni relative a singole stazioni di prelievo e la strumentazione da utilizzare deve essere scelta in funzione delle caratteristiche dei fondali e dei sedimenti stessi.

L'area di prelievo deve essere inquadrata a livello meteo-acquatico, idrogeologico, geologico e geomorfologico e deve essere allestito un piano di campionamento che preveda i punti di campionamento, la strumentazione adeguata e le modalità di prelievo e le eventuali sezioni di sedimento da analizzare.

Ogni stazione di campionamento dovrebbe essere georeferenziata mediante registrazione delle coordinate geografiche o chilometriche visualizzate sul *Differential Global Positioning System* (DGPS), in grado di garantire il corretto posizionamento durante le attività di prelievo e di acquisizione dei dati.

All'atto del campionamento, per ogni stazione di prelievo, deve essere compilata una scheda dove riportare i dati inerenti il punto di campionamento, la strumentazione utilizzata, i nomi degli operatori e il numero e la sigla dei campioni prelevati. Infine devono essere anche riportate la descrizione macroscopica del campione, le caratteristiche fisiche come colore, odore, grado di idratazione, la presenza di resti vegetali o di frammenti conchigliari, le eventuali variazioni cromatiche e dimensionali.

La quantità di campione da prelevare è strettamente correlata alla tipologia del sedimento e alla quantità di materiale necessaria all'espletamento delle determinazioni analitiche previste dalle indagini e il prelievo deve prevedere il recupero di materiale il più possibile indisturbato. Per l'espletamento delle analisi microbiologiche il quantitativo di sedimento da prelevare non deve essere inferiore a 100 g.

L'obiettivo dell'indagine, e la notevole variazione spazio-temporale dei parametri chimico-fisici e microbiologici dei sedimenti, richiedono una strumentazione opportuna, in funzione del livello sedimentario da investigare, superficiale o profondo.

Il campionamento può essere effettuato manualmente o possono essere utilizzate benne a diversa tipologia, *box corer*, carotieri (per campionamenti stratigrafici in profondità) e *liner*.

Il campionamento manuale può essere eseguito tramite sessola o cucchiaio metallico anche in caso di acqua poco profonda e in presenza di sedimenti di modesto spessore. Con un battente idrico maggiore possono essere utilizzate prolunghe. Tale tecnica di prelievo obbliga che la fase di risalita della spatola/sessola sia effettuata con estrema cura al fine di ridurre al minimo la perdita della frazione più fine di sedimento. Nel caso in cui, inoltre, il battente d'acqua sia pari o inferiore a 10 metri di profondità, il campionamento manuale può essere condotto mediante un carotiere leggero manovrato da un subacqueo.

Nel caso di sedimenti superficiali sommersi, fino ad uno spessore di 50 cm, possono essere utilizzati strumenti meccanici come *box corer* o benne, calati nella stazione di campionamento mediante un verricello, e operatori subacquei muniti di *liner*, con caratteristiche idonee a prelevare l'intero spessore o comunque uno strato di materiale non inferiore ai primi 20 cm.

Nel caso di sedimenti profondi, fino a 1 m di spessore, laddove la natura del fondale lo consenta, il campionamento può essere condotto anche manualmente, per mezzo di un operatore subacqueo munito di *liner*, recuperando almeno i primi 80 cm di materiale.

Di seguito sono rapidamente descritte alcune apparecchiature per il prelievo di sedimenti.

La benna è utilizzabile per effettuare il prelievo di sedimento all'interfaccia acqua-sedimento prelevando una porzione del sedimento superficiale.

La benna Ekman-Birge può essere utilizzata per il prelievo di sedimento da fondali incoerenti a granulometria fine liberi da vegetazione o da orizzonti sabbiosi e/o rocciosi e il recupero operato è sufficientemente indisturbato.

La benna Van Veen e la benna Shipek sono adatte per studi ambientali. Generalmente in acciaio o acciaio inossidabile sono dotate di sportellini superiori per il prelievo del campione. Durante il campionamento, tali tipologie di benna, progettate per fondali incoerenti e/o debolmente sabbiosi, arrecano al sedimento un disturbo comparabile in funzione del volume dello strumento e delle caratteristiche granulometriche del campione. La benna Van Veen durante la sua apertura arreca un maggiore disturbo al campione rendendo più difficile il prelievo del livello superficiale (0÷3 cm); a tale problema si può ovviare utilizzando il modello dotato di sportellini superiori. Entrambi i tipi di benna, sia Van Veen che Shipek, non consentono di campionare i livelli profondi e di apprezzare le variazioni verticali delle caratteristiche del materiale recuperato.

Il *box corer* è uno strumento a gravità per il campionamento, lungo tutto lo spessore, di sedimenti indisturbati. È utilizzato su fondali con sedimenti a granulometria fine e in coincidenza di discreti volumi di sedimento. Particolarmente indicato in caso di numerose analisi da eseguire (ad es. analisi ecotossicologiche). La sua capacità di recupero interessa i 20÷30 cm di spessore.

Il *box corer* è costituito praticamente da una "scatola" a base quadrata o rettangolare, zavorrata e in grado di penetrare il fondale; il recupero del sedimento è assicurato da una chiusura basale. Date le modalità di campionamento e di recupero, il campione, in particolare la sua parte centrale, può essere considerato indisturbato. Tale strumento consente sia il campionamento del livello superficiale (0÷3) cm sia quello di livelli più profondi e permette inoltre di effettuare una accurata descrizione del sedimento lungo tutto lo spessore recuperato.

Il *liner* è costituito da un tubo in metacrilato trasparente che consente l'immediata visualizzazione della carota prelevata. Il diametro interno è circa 10 cm con una lunghezza che varia dai 2 m ai 65 cm.

A seconda delle condizioni del corpo idrico e della sua estensione, il campionamento dovrebbe essere effettuato secondo schemi geometrici di prelievo, come transetti, maglie linee e/o la combinazione di detti schemi geometrici. Di seguito vengono brevemente descritti alcuni schemi di campionamento.

La modalità di campionamento a transetti è particolarmente indicata per aree di notevole estensione prive di specifiche indicazioni di attività contaminanti e si esegue lungo linee perpendicolari alla linea di costa o di riva.

Il campionamento a maglie è particolarmente indicato per dettagliare aree interessate da una contaminazione di grado medio-alto ascrivibile ad attività inquinanti sul territorio.

Il campionamento a linee è particolarmente utile per caratterizzare sedimenti di canali o fiumi. È condotto effettuando i prelievi secondo linee perpendicolari lungo tali corpi idrici e può essere integrato con la modalità a transetti qualora l'area sia interessata da particolari contesti di criticità.

Il campionamento misto si avvale di tutte le precedenti modalità descritte per dettagliare aree, più o meno estese, qualora siano presenti condizioni riconducibili alle situazioni sopra descritte.

Ogni prelievo di sedimento dovrebbe generalmente essere considerato rappresentativo del punto preciso da cui il materiale è stato asportato e quindi specchio del suo particolare stato di contaminazione; pertanto, non si effettua il campione composito per tale tipologia di matrice.

Per l'espletamento delle analisi microbiologiche devono essere utilizzati contenitori sterili di polietilene o polistirolo con trasporto e conservazione in laboratorio a circa 4°C e devono essere analizzati entro le 24 ore successive al prelievo.

Bibliografia

- Burge WD, Enkiri NK, Hussong D. *Salmonella* regrowth in compost as influenced by substrate. *Microb Ecol* 1987;14(3):243-53.
- Castrignanò A. Campionamento. In: Pagliai M (Ed.). *Metodi di analisi fisica del suolo*. Milano: Franco Angeli; 1997. p. 1-13.
- Italia. Decreto Ministeriale 13 settembre 1999. Approvazione dei Metodi Ufficiali di Analisi Chimica del Suolo. *Gazzetta ufficiale – Serie generale* n. 248, 21 ottobre 1999. *Supplemento Ordinario* n.185.
- Italia. Decreto Ministeriale 8 luglio 2002, n. 010175. Approvazione e Ufficializzazione dei Metodi di Analisi Microbiologica. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 179, 1 agosto 2002. *Supplemento Ordinario* n. 156.
- Lison L. *Statistica Applicata alla Biologia Sperimentale: la programmazione dell'esperimento e l'analisi dei risultati*. Milano: Ambrosiana; 1989.
- Zaleski KJ, Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Potential regrowth and recolonization of *salmonellae* and indicators in biosolids and biosolid-amended soil. *Appl Environ Microbiol* 2005;71(7):3701-8.

APPENDICE A
Attrezzature di base per le analisi microbiologiche

Introduzione

Le indagini microbiologiche presuppongono l'uso di specifiche dotazioni e attrezzature di laboratorio. Di seguito vengono descritti alcuni dispositivi e apparecchiature di uso più comune nei laboratori per l'analisi microbiologica.

Per l'organizzazione di un laboratorio di microbiologia è necessario attenersi a quanto definito dal D.Lvo 81/2008 e s.m.i. che così stabilisce: "il datore di lavoro adotta idonee misure di contenimento in conformità all'Allegato XLVII".

Per ottenere elevati standard di sicurezza e prevenzione per coloro che lavorano in laboratorio è necessario che gli operatori siano comunque adeguatamente informati sui rischi e sulle corrette modalità di utilizzo delle apparecchiature presenti nel laboratorio, nonché sulle modalità di manipolazione di matrici di diversa natura, sull'uso delle cappe biohazard e dei dispositivi di protezione individuale. È opportuno anche pianificare un sistema che preveda lo svolgimento di attività di formazione per l'acquisizione delle conoscenze e delle capacità sull'attuale normativa in materia di prevenzione dei rischi derivanti dall'uso di sostanze chimiche, di agenti fisici e di agenti biologici in ambiente laboratoristico, sulle metodologie di valutazione del rischio, sull'uso e sul corretto impiego dei dispositivi di protezione individuale e sulla gestione delle emergenze.

In considerazione del gruppo di appartenenza degli agenti biologici con cui si opera (gruppo 2, 3, 4), per uso deliberato o per esposizione potenziale, agli operatori dei laboratori devono essere garantite dal datore di lavoro misure idonee e livelli di contenimento conformi a quanto indicato nell'Allegato XLVII del D.Lvo 81/2008 e s.m.i., fatto salvo quanto specificatamente previsto dall'Allegato XLVI, punto 6.

Pertanto, le caratteristiche strutturali per i laboratori di base, dove vi è uso di materiali con possibile contaminazione da agenti patogeni per l'uomo, devono essere tali da assicurare spazi interni tali da garantire gli spostamenti e le attività in sicurezza, evitando possibili scontri accidentali contro le apparecchiature o tra gli operatori. Quindi, prima dell'acquisto di qualsiasi apparecchiatura per il laboratorio è necessario sia definito, all'interno dei locali, il posizionamento della strumentazione da acquistare. Dovrà essere quindi valutato che lo spazio e la collocazione assegnati allo strumento siano idonei per l'esecuzione delle Procedure Operative Standard; le condizioni ambientali (temperatura, umidità, insolazione) e al contorno (es. presenza di vibrazioni) siano adeguate e siano rispettate le norme di sicurezza sia in rapporto ad eventuali rischi ambientali (diffusione di bioaerosol e polveri, di sostanze tossiche), sia in relazione alle strutture e agli impianti.

Quando si eseguono analisi microbiologiche ambientali, è di particolare importanza che siano isolati o enumerati solo i microrganismi presenti nei campioni e che essi non contaminino l'ambiente.

Per conseguire questo obiettivo è necessario dedicare attenzione all'igiene personale e utilizzare tecniche di lavoro che garantiscano, per quanto possibile, l'esclusione di contaminazioni esterne. Pertanto, nel presente capitolo è possibile fornire solo alcuni esempi delle precauzioni da assumere durante lo svolgimento di esami microbiologici.

Per eseguire analisi microbiologiche è necessaria una conoscenza completa delle tecniche microbiologiche e dei microrganismi interessati. È importante che le analisi siano condotte con la maggiore accuratezza possibile, il calcolo del numero di microrganismi ricercati sia eseguito conformemente alla tecnica e al microrganismo da determinare e che sia garantita la buona riproducibilità dei risultati.

Di seguito vengono descritte alcune tra le principali attrezzature per la preparazione, sterilizzazione e conservazione dei terreni colturali e le procedure generali per il controllo delle apparecchiature.

Generalità

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Apparecchi per sterilizzazione

Autoclavi

La sterilizzazione a vapore saturo sotto pressione (per terreni di coltura, bottiglie da prelievo, attrezzature filtranti, eventualmente rifiuti infetti, ecc.) richiede l'impiego di autoclavi di capacità adeguate al materiale da sterilizzare che non dovrà essere eccessivamente ammassato. Non utilizzare l'autoclave per sterilizzare materiali puliti e decontaminare materiali usati contemporaneamente. La sterilizzazione di norma si effettua alla temperatura di $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ con una atmosfera di pressione per un tempo di $(15 \div 20)$ minuti.

Per il corretto uso dell'autoclave attenersi scrupolosamente alle indicazioni del costruttore e prevedere l'esecuzione di controlli periodici da parte di ditte specializzate.

Lampade a raggi ultravioletti

I sistemi di sterilizzazione con raggi ultravioletti (UV) sono particolarmente idonei per la sterilizzazione dell'ambiente sotto cappa o per piccoli locali. È da tenere presente che la vita media di una lampada a UV è di circa 5000 ore e che comunque è necessario effettuare, per mantenerne l'efficacia, una sua manutenzione periodica (pulizia con eliminazione della polvere, ecc.).

Per l'individuazione di alcuni microrganismi cresciuti in brodi o terreni di coltura si ricorre, in alcuni casi, all'uso di una speciale lampada a raggi ultravioletti, la lampada di Wood, che permette di evidenziare la presenza dei microrganismi specifici che, ad una determinata lunghezza d'onda, fluorescono.

L'uso di lampade a raggi ultravioletti richiede precauzioni particolari per evitare danni agli occhi e alla pelle degli operatori (usare DPI).

Stufe a secco

Le stufe per la sterilizzazione devono consentire il mantenimento della temperatura di 170°C per 2 ore. È comunque possibile mantenere, in funzione del prodotto da sottoporre a sterilizzazione, le temperature di 180°C/30' - 60'; 170°C/60'; 160°C/120'; 150°C/150'; 140°C/180'.

Le stufe è necessario siano corredate di un termometro a gambo lungo, di precisione accettabile nell'intervallo fra 160°C e 180°C e di un idoneo sistema di termoregolazione. È altresì opportuno che siano fornite di un sistema di interruttore a tempo che consenta di programmare il tempo di sterilizzazione. Per il corretto uso delle stufe attenersi scrupolosamente alle indicazioni del costruttore e prevedere l'esecuzione di controlli periodici da parte di ditte specializzate.

Apparecchiature per la misura del pH

Il pH dei terreni di coltura e delle soluzioni può essere determinato per via potenziometrica con l'uso di piaccametri che devono avere una precisione di misura di $\pm 0,2$ unità di pH a 20°C e la sua soglia di misurazione minima deve essere 0,01 unità di pH.

La determinazione per via colorimetrica dovrebbe essere evitata perché fornisce risultati poco precisi.

Attrezzature per l'incubazione

Armadi termostatici, camere termostatiche e termostati

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata e assicurare nei vari compartimenti una temperatura costante, entro limiti di variazione non eccedenti $\pm 1^\circ\text{C}$. Sono preferibili gli armadi termostatici a camicia d'acqua. Sia gli armadi termostatici che le camere termostatiche e i termostati dovranno essere muniti di un doppio sistema di termoregolazione, uno per il mantenimento della temperatura di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura lievemente superiore (temperatura massima di sicurezza) che non dovrà mai essere superata.

Di norma vengono utilizzati incubatori regolabili, a temperatura variabile, da quella ambiente a 80°C. Per temperature intorno ai 20°C sono comunque da utilizzare frigotermostati. Essi devono garantire la temperatura di incubazione prevista dal metodo analitico.

È opportuno che queste apparecchiature siano provviste inoltre di termometri per il controllo visivo della temperatura, con una scala che consenta la lettura di 1°C, o di un display e, possibilmente, di un sistema termometrico di registrazione.

Gli armadi termostatici di notevoli dimensioni e le camere termostatiche dovranno essere muniti di un idoneo sistema di circolazione dell'aria che consenta il mantenimento della temperatura richiesta in tutti i punti del vano.

È altresì opportuno che queste apparecchiature siano dotate di un sistema che consenta il mantenimento di un livello di umidità compreso fra il 75 e l'80%. Ciò può essere ottenuto anche con un recipiente contenente acqua, collocato sul fondo.

Il materiale posto ad incubare dovrà essere disposto in modo da consentire la circolazione della temperatura e non essere eccessivamente ammassato.

Bagni termostatici

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata ed essere provvisti di un doppio sistema di controllo della temperatura costituito da un sistema di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura superiore (temperatura di sicurezza) che non dovrà mai essere superata. Dovranno inoltre essere provvisti di termometri per il controllo visivo della temperatura e possibilmente di un sistema termometrico di registrazione ed eventualmente di un idoneo sistema di agitazione dell'acqua. Per il loro riempimento è necessario utilizzare acqua distillata che deve essere comunque rinnovata regolarmente. Per evitare fenomeni di corrosione è opportuno utilizzare filiere o idonei cestelli di acciaio inossidabile o di materiale plastico idoneo. L'eventuale sviluppo di alghe o di funghi nell'acqua deve essere eliminato mediante l'uso di composti ammoniacali quaternari da fare agire per circa 24 ore, provvedendo poi allo svuotamento, risciacquo e successivo riempimento con acqua distillata.

Bilance

In laboratori attrezzati per l'esecuzione di indagini microbiologiche può essere sufficiente disporre di bilance che permettono di pesare quantità intorno a 150 g con sensibilità di 0,1 g.

Per la pesata di additivi, reagenti, coloranti ecc., è necessario disporre di bilance analitiche con una sensibilità di 0,1 mg. Le bilance devono essere sottoposte a taratura periodica.

Cappe per la sicurezza biologica

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

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

Esistono tre tipi di cappe di sicurezza biologica: classe I, II, e III (Tabella A1). La loro efficacia dipende dal flusso dell'aria, dalla capacità di contenimento, dall'integrità dei filtri HEPA (*High Efficiency Particulate Air filter*) e, nel caso delle cappe I e II, dalla loro posizione nella stanza in relazione alle correnti di aria e ai movimenti del personale (vanno poste lontano dalle zone di passaggio e da correnti d'aria provenienti da porte, finestre e dall'impianto di aerazione).

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

La cappa di sicurezza biologica classe I è una cappa ventilata aperta frontalmente progettata per la protezione dell'operatore, tramite un flusso d'aria entrante che non viene rimandata in circolo. Non proteggono dalla contaminazione i materiali all'interno della cappa (la sterilità non è quindi garantita). È dotata di un filtro HEPA allo scarico per proteggere l'ambiente dalla fuoriuscita di microrganismi.

Tabella A1. Caratteristiche delle cappe per la sicurezza biologica

Classe	% aria in ricircolo	Caratteristiche	Impieghi	Protezione		
				operatore	ambiente	campione
I		apertura frontale, aria esterna dall'apertura frontale, filtro HEPA sull'aria in uscita	basso rischio; microrganismi di gruppo 1-2	buona	ottima	scarsa
II A	70	apertura frontale con ingresso dell'aria, flusso laminare verticale, filtro HEPA sull'aria in ingresso e uscita, se sostanze mutagene, cancerogene, radioattive l'aria espulsa deve essere convogliata all'esterno	medio rischio; microrganismi di gruppo 2-3	buona	ottima	ottima
II B 1	30					
II B 2	0					
III		chiusura ermetica, a pressione negativa, accesso consentito da guanti; filtro HEPA sull'aria in ingresso, doppio filtro HEPA sull'aria in uscita	alto rischio; microrganismi di gruppo 4	ottima	ottima	buona

La cappa di sicurezza biologica classe II è una cappa ventilata aperta frontalmente progettata per la protezione dell'operatore, dei prodotti al suo interno e dell'ambiente circostante. Il flusso laminare è comune a tutte le cappe di classe II mentre in base alla percentuale di aria riciclata ed alla velocità dell'aria le cappe di classe II sono suddivise in diversi tipi. Questi tipi di cappa sono utilizzabile per eseguire analisi microbiologiche ambientali che prevedano la ricerca di microrganismi a rischio medio (gruppi di rischio 2 e 3). È caratterizzata da un flusso d'aria in ingresso e con filtrazione sia dell'aria aspirata sia di quella espulsa: il flusso laminare, proveniente dal filtro HEPA, scende perpendicolarmente al piano di lavoro evitando di investire l'operatore, l'aria espulsa deve essere filtrata da un secondo filtro HEPA e, se ricircolata nello stesso locale, da un filtro supplementare a carbone attivo posto a valle del filtro HEPA, per trattenere eventuali frazioni gassose.

Esistono anche cappe di sicurezza biologica classe III, ventilate e totalmente chiuse, a tenuta d'aria e pressione negativa. L'aria in ingresso passa per un filtro HEPA e quella in uscita passa per due filtri HEPA posti in serie. L'attività analitica all'interno di essa viene svolta con guanti a manica in gomma attaccati alla cappa. Sono usate per lavorare con agenti biologici ad alto rischio (gruppo di rischio 4) e forniscono una barriera totale tra l'operatore e il lavoro. Nelle cappe classe III non vanno usati gas infiammabili.

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

Centrifughe e frigoriferi

Possono essere utilizzate centrifughe da banco e da terra con rotori ad inclinazione fissa o variabile. Possono essere refrigerate o meno in base alle necessità. È necessario utilizzare centrifughe realizzate secondo le norme di sicurezza internazionali e con marchio CE.

Frigoriferi e congelatori devono avere un dispositivo di rilevazione della temperatura e impiegare per il controllo interno un termometro a minima e a massima oppure un termometro con bulbo immerso in glicerolo.

I frigoriferi devono assicurare una temperatura di $(5\pm 3)^{\circ}\text{C}$ e i congelatori da utilizzare possono essere quelli che raggiungono temperature di $(-20\pm 3)^{\circ}\text{C}$ e $(-70\pm 3)^{\circ}\text{C}$.

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

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

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

Devono essere effettuate con cadenza periodica le operazioni che prevedano:

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

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

Membrane filtranti e apparecchiature per filtrazione

Membrane filtranti

Le membrane filtranti per uso batteriologico sono generalmente costituite da dischi di esteri di cellulosa con pori uniformemente distribuiti; sono comunque utilizzate, per situazioni particolari, anche membrane di nylon e policarbonato. Generalmente per le analisi microbiologiche si utilizzano membrane con pori aventi un diametro nominale di $0,45 \mu\text{m}$ ($\pm 0,02 \mu\text{m}$) (pori simmetrici da $0,45 \mu\text{m}$ oppure pori asimmetrici da $0,7/0,2 \mu\text{m}$). Le membrane, a causa della loro porosità hanno la capacità di trattenere sulla loro superficie, all'atto della filtrazione, i batteri contenuti nel campione che svilupperanno colonie sulla superficie di una membrana posta su terreno colturale; dopo un idoneo periodo di incubazione, per passaggio per capillarità dei principi contenuti nel terreno, da campioni positivi, si sviluppano colonie visibili.

Esistono in commercio membrane filtranti di vario diametro. Per l'esame batteriologico di campioni ambientali vengono normalmente utilizzate membrane del diametro di 47-50 mm.

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

Pur possedendo caratteristiche simili, le membrane possono differenziarsi a seconda della ditta di produzione. Problemi si possono verificare in relazione al tipo di membrane utilizzate: inibizione batterica o crescita in corrispondenza della linea del reticolo, sciamaatura delle colonie, presenza di zone idrofobiche. Per evitare, pertanto, l'uso di membrane non idonee, sarebbe consigliabile verificarne l'efficienza prima delle analisi.

Apparecchiature per la filtrazione

Nel caso dell'esame batteriologico di campioni ambientali, vengono di norma utilizzate apparecchiature idonee per la filtrazione di volumi ridotti (10–100 mL) per i controlli di routine. Dette apparecchiature devono essere adatte per l'impiego di membrane filtranti del diametro di 47–50 mm. Sono costituite da una rampa con supporti e contenitori che possono essere in acciaio inossidabile, vetro, policarbonato o polipropilene. Possono essere impiegate apparecchiature singole o in serie, utilizzando, come sistema aspirante, una pompa da vuoto azionata elettricamente o una pompa ad acqua. Fra sistema filtrante e sistema aspirante può essere interposto un idoneo sistema per la raccolta dell'acqua filtrata.

I supporti e i contenitori devono essere sterilizzati in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti, dopo accurato lavaggio e asciugatura e prima della sterilizzazione devono essere avvolti in carta idonea per

mantenere la sterilità durante la conservazione prima dell'uso. Possono essere utilizzati entro due settimane dalla sterilizzazione, se conservati in condizioni ottimali.

Apparecchiature per il supporto di membrane di diametro più grande (ad esempio, 120 mm), in genere di acciaio inossidabile, sono utilizzate per filtrazioni di volumi maggiori di liquido.

Microscopi

Per le normali procedure di analisi microbiologica (es. colorazione di Gram) è sufficiente disporre di un microscopio ottico con obiettivi 10, 40 e 100x, vetrini portaoggetti e coprioggetti e olio ad immersione. Dopo ogni utilizzo rimuovere il residuo di olio sulle lenti con carta ottica. Quando non in uso, il microscopio va tenuto coperto e al riparo dalla luce, per evitare danni alle lenti.

Microscopi con caratteristiche particolari (a epifluorescenza, stereomicroscopio) possono essere utilizzati per specifiche attività analitiche.

È opportuno collocare i microscopi in posizione stabile. Per il microscopio ottico si consiglia la dotazione di un sistema per l'osservazione in contrasto di fase e di una serie di obiettivi, in modo da coprire un intervallo di ingrandimenti sufficientemente elevato, e di sistemi per la regolazione dell'intensità luminosa.

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

Incubatori in atmosfera modificata

Consistono in giare, incubatori, cappe o altri sistemi a tenuta, idonei a creare aree a composizione gassosa controllata. Le condizioni di anaerobiosi devono essere verificate con appositi dispositivi.

Per incubare in anaerobiosi o in microaerofilia in giara si usano generalmente contenitori con guarnizione in cui l'atmosfera viene creata con particolari prodotti chimici che, una volta attivati con l'acqua, producono idrogeno in quantità sufficiente per abbassare il livello di ossigeno nelle giare al di sotto dell'1% v/v. Queste sostanze generano anche anidride carbonica alla concentrazione di 5-8% nella giara e questo fattore migliora la crescita di molti anaerobi.

Per il corretto uso di queste apparecchiature attenersi scrupolosamente alle indicazioni della ditta produttrice.

Omogenizzatori, stomaker, sonicatori

L'utilizzo di questi apparecchi può dar luogo a formazioni di schizzi ed aerosol causati da una pressione prodotta all'interno dei contenitori. Per contenere questi rischi, particolarmente in presenza di materiale potenzialmente infettante per via aerea, occorre:

- usarli in cappa di sicurezza biologica, quando si tratta di materiale contaminato o potenzialmente contaminato con agenti biologici (DL.vo 81/2008, Titolo X);
- riempire ed aprire il contenitore in cappa di sicurezza biologica; attendere circa 10' prima di aprire il contenitore per permettere agli aerosol di depositarsi;
- verificare prima dell'uso le condizioni dei contenitori (bicchieri, sacchetti) e delle chiusure (tappi e coperchi), evitare l'uso di contenitori di vetro, e comunque accertarsi che non siano incrinati;
- evitare di riempire i contenitori oltre misura;
- indossare guanti e utilizzare protezioni per il viso, camice monouso.

Termometri

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

Vetreteria e materiale monouso

È da preferire la vetreteria fabbricata con vetro neutro, resistente alle temperature di sterilizzazione. Prima della sterilizzazione – da effettuare con calore secco alla temperatura di $(180\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 30 o 60 minuti o con calore umido a $(121\pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti – la vetreteria deve essere accuratamente lavata in modo da assicurare la completa eliminazione di residui organici o di sostanze che possono esplicare azione antibatterica. Per il controllo della sterilizzazione utilizzare prodotti specifici: indicatori biologici o integratori chimico-fisici per la verifica della sterilizzazione a calore umido e indicatori biologici per la verifica della sterilizzazione a calore secco.

Dopo lavaggio e asciugatura la vetreteria, per essere sterilizzata, deve essere confezionata in modo idoneo a consentire il mantenimento della sterilità durante la conservazione.

Negli ultimi anni si è andato sempre più diffondendo l'uso di materiali plastici monouso, forniti in confezioni già sterili. Il vantaggio di usare questi materiali è legato soprattutto al risparmio di manodopera impiegata nelle lunghe procedure di lavaggio, confezionamento e sterilizzazione dei materiali in vetro. I materiali plastici da usare nel laboratorio batteriologico devono però essere esenti da residui tossici della lavorazione, essere trasparenti e avere segni di calibrazione che corrispondano a precise indicazioni volumetriche.

Esistono in commercio anche articoli in materiale plastico che possono essere utilizzati e sottoposti a ripetute sterilizzazioni in autoclave.

Bottiglie e contenitori per i prelievi

Possono essere di vetro neutro, resistenti alla sterilizzazione, da chiudere con tappo smerigliato o con idoneo tappo a vite. Prima della sterilizzazione, le bottiglie e i contenitori con tappo smerigliato debbono essere provvisti di un cappuccio di copertura in carta resistente e impermeabile o in foglio di alluminio. Tale tipo di protezione non è richiesto per le bottiglie e i contenitori muniti di tappo a vite.

Per il campionamento possono essere anche utilizzati bottiglie e contenitori monouso in materiale plastico, disponibili in commercio già sterili, in genere in confezioni multiple.

Bottiglie e tubi per diluizione, beute, cilindri tarati

È da utilizzare preferibilmente materiale in vetro, resistente alla sterilizzazione.

Le bottiglie e i tubi per diluizione dovranno essere provvisti di tappo smerigliato, a scatto, di gomma o a vite. Possono essere impiegate anche bottiglie (o tubi) di plastica, fabbricate con materiale idoneo e non tossico, anche resistenti alla sterilizzazione in autoclave.

Pipette e micropipette

Per le varie operazioni di analisi possono occorrere pipette di varia capacità (da 1, da 5 e da 10 mL), graduate fino alla punta, con suddivisione a 0,1 mL.

L'uso di pipette di vetro riutilizzabili munite di filtro di cotone grezzo all'estremità superiore è stato superato da quello di pipette di materiale plastico.

Sono disponibili in commercio confezioni di pipette monouso in materiale plastico, di varia misura, già sterili. Per volumi più piccoli possono essere comunque utilizzate micropipette manuali, elettroniche, monocanale o multicanale da utilizzarsi con appositi puntali monouso.

Per la sicurezza dell'operatore è necessario non pipettare con la bocca, ma utilizzare sempre pipettatrici automatiche o sistemi di aspirazione tipo pompe aspiranti a bulbo di gomma.

Tubi per coltura

I tubi possono essere usati per la tecnica dei tubi multipli, per l'esecuzione di test biochimici, per la conservazione di colture batteriche, ecc. Si utilizzano tubi di diverse dimensioni in relazione all'utilizzo. I tubi devono essere chiusi utilizzando preferibilmente tappi in metallo, in materiale plastico o in cotone grezzo. Sono decisamente da preferire i tubi in vetro resistente alla corrosione e alla sterilizzazione; tubi o provette monouso sono consigliabili per l'esecuzione di tecniche molecolari.

Capsule di Petri

Capsule di Petri in vetro sono state usate per lungo tempo in batteriologia. Negli ultimi anni esse sono state quasi totalmente sostituite da piastre monouso, in materiale plastico che si trovano in commercio già sterili in confezioni sigillate.

L'uso delle capsule di Petri è indispensabile per l'isolamento di colture batteriche e per l'analisi effettuata con la tecnica della filtrazione su membrana. Vengono utilizzate capsule di Petri di varie dimensioni. Il tipo più diffuso ha un diametro di circa 100 mm e un'altezza di 15 mm. Per la filtrazione di liquidi, poiché la tecnica standardizzata prevede l'utilizzo di membrane di 47 mm di diametro, si possono usare capsule di diametro anche di 50 mm e dello spessore di 12 mm.

Indipendentemente dal materiale (vetro o plastica) le capsule di Petri devono essere con il fondo perfettamente piano e perfettamente trasparenti al fine di rendere ottimale il riconoscimento delle colonie.

APPENDICE B
MPN: tabelle per il calcolo

Tabella B1.1. Tabella MPN Quanty-Tray/2000 (piccoli pozzetti positivi 0-24)

PG	PP+																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0	<1	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0	13,0	14,1	15,1	16,1	17,1	18,1	19,1	20,2	21,2	22,2	23,3	24,3
1	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,1	8,1	9,1	10,1	11,1	12,1	13,2	14,2	15,2	16,2	17,3	18,3	19,3	20,4	21,4	22,4	23,5	24,5	25,6
2	2,0	3,0	4,1	5,1	6,1	7,1	8,1	9,2	10,2	11,2	12,2	13,3	14,3	15,4	16,4	17,4	18,5	19,5	20,6	21,6	22,7	23,7	24,8	25,8	26,9
3	3,1	4,1	5,1	6,1	7,2	8,2	9,2	10,3	11,3	12,4	13,4	14,5	15,5	16,5	17,6	18,6	19,7	20,8	21,8	22,9	23,9	25,0	26,1	27,1	28,2
4	4,1	5,2	6,2	7,2	8,3	9,3	10,4	11,4	12,5	13,5	14,6	15,6	16,7	17,8	18,8	19,9	21,0	22,0	23,1	24,2	25,3	26,3	27,4	28,5	29,6
5	5,2	6,3	7,3	8,4	9,4	10,5	11,5	12,6	13,7	14,7	15,8	16,9	17,9	19,0	20,1	21,2	22,2	23,3	24,4	25,5	26,6	27,7	28,8	29,9	31,0
6	6,3	7,4	8,4	9,5	10,6	11,6	12,7	13,8	14,9	16,0	17,0	18,1	19,2	20,3	21,4	22,5	23,6	24,7	25,8	26,9	28,0	29,1	30,2	31,3	32,4
7	7,5	8,5	9,6	10,7	11,8	12,8	13,9	15,0	16,1	17,2	18,3	19,4	20,5	21,6	22,7	23,8	24,9	26,0	27,1	28,3	29,4	30,5	31,6	32,8	33,9
8	8,6	9,7	10,8	11,9	13,0	14,1	15,2	16,3	17,4	18,5	19,6	20,7	21,8	22,9	24,1	25,2	26,3	27,4	28,6	29,7	30,8	32,0	33,1	34,3	35,4
9	9,8	10,9	12,0	13,1	14,2	15,3	16,4	17,6	18,7	19,8	20,9	22,0	23,2	24,3	25,4	26,6	27,7	28,9	30,0	31,2	32,3	33,5	34,6	35,8	37,0
10	11,0	12,1	13,2	14,4	15,5	16,6	17,7	18,9	20,0	21,1	22,3	23,4	24,6	25,7	26,9	28,0	29,2	30,3	31,5	32,7	33,8	35,0	36,2	37,4	38,6
11	12,2	13,4	14,5	15,6	16,8	17,9	19,1	20,2	21,4	22,5	23,7	24,8	26,0	27,2	28,3	29,5	30,7	31,9	33,0	34,2	35,4	36,6	37,8	39,0	40,2
12	13,5	14,6	15,8	16,9	18,1	19,3	20,4	21,6	22,8	23,9	25,1	26,3	27,5	28,6	29,8	31,0	32,2	33,4	34,6	35,8	37,0	38,2	39,5	40,7	41,9
13	14,8	16,0	17,1	18,3	19,5	20,6	21,8	23,0	24,2	25,4	26,6	27,8	29,0	30,2	31,4	32,6	33,8	35,0	36,2	37,5	38,7	39,9	41,2	42,4	43,6
14	16,1	17,3	18,5	19,7	20,9	22,1	23,3	24,5	25,7	26,9	28,1	29,3	30,5	31,7	33,0	34,2	35,4	36,7	37,9	39,1	40,4	41,6	42,9	44,2	45,4
15	17,5	18,7	19,9	21,1	22,3	23,5	24,7	25,9	27,2	28,4	29,6	30,9	32,1	33,3	34,6	35,8	37,1	38,4	39,6	40,9	42,2	43,4	44,7	46,0	47,3
16	18,9	20,1	21,3	22,6	23,8	25,0	26,2	27,5	28,7	30,0	31,2	32,5	33,7	35,0	36,3	37,5	38,8	40,1	41,4	42,7	44,0	45,3	46,6	47,9	49,2
17	20,3	21,6	22,8	24,1	25,3	26,6	27,8	29,1	30,3	31,6	32,9	34,1	35,4	36,7	38,0	39,3	40,6	41,9	43,2	44,5	45,9	47,2	48,5	49,8	51,2
18	21,8	23,1	24,3	25,6	26,9	28,1	29,4	30,7	32,0	33,3	34,6	35,9	37,2	38,5	39,8	41,1	42,4	43,8	45,1	46,5	47,8	49,2	50,5	51,9	53,2
19	23,3	24,6	25,9	27,2	28,5	29,8	31,1	32,4	33,7	35,0	36,3	37,6	39,0	40,3	41,6	43,0	44,3	45,7	47,1	48,4	49,8	51,2	52,6	54,0	55,4
20	24,9	26,2	27,5	28,8	30,1	31,5	32,8	34,1	35,4	36,8	38,1	39,5	40,8	42,2	43,6	44,9	46,3	47,7	49,1	50,5	51,9	53,3	54,7	56,1	57,6
21	26,5	27,9	29,2	30,5	31,8	33,2	34,5	35,9	37,3	38,6	40,0	41,4	42,8	44,1	45,5	46,9	48,4	49,8	51,2	52,6	54,1	55,5	56,9	58,4	59,9
22	28,2	29,5	30,9	32,3	33,6	35,0	36,4	37,7	39,1	40,5	41,9	43,3	44,8	46,2	47,6	49,0	50,5	51,9	53,4	54,8	56,3	57,8	59,3	60,8	62,3
23	29,9	31,3	32,7	34,1	35,5	36,8	38,3	39,7	41,1	42,5	43,9	45,4	46,8	48,3	49,7	51,2	52,7	54,2	55,6	57,1	58,6	60,2	61,7	63,2	64,7
24	31,7	33,1	34,5	35,9	37,3	38,8	40,2	41,7	43,1	44,6	46,0	47,5	49,0	50,5	52,0	53,5	55,0	56,5	58,0	59,5	61,1	62,6	64,2	65,8	67,3
25	33,6	35,0	36,4	37,9	39,3	40,8	42,2	43,7	45,2	46,7	48,2	49,7	51,2	52,7	54,3	55,8	57,3	58,9	60,5	62,0	63,6	65,2	66,8	68,4	70,0

segue

continua

PG +	PP+																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
26	35,5	36,9	38,4	39,9	41,4	42,8	44,3	45,9	47,4	48,9	50,4	52,0	53,5	55,1	56,7	58,2	59,8	61,4	63,0	64,7	66,3	67,9	69,6	71,2	72,9
27	37,4	38,9	40,4	42,0	43,5	45,0	46,5	48,1	49,6	51,2	52,8	54,4	56,0	57,6	59,2	60,8	62,4	64,1	65,7	67,4	69,1	70,8	72,5	74,2	75,9
28	39,5	41,0	42,6	44,1	45,7	47,3	48,8	50,4	52,0	53,6	55,2	56,9	58,5	60,2	61,8	63,5	65,2	66,9	68,6	70,3	72,0	73,7	75,5	77,3	79,0
29	41,7	43,2	44,8	46,4	48,0	49,6	51,2	52,8	54,5	56,1	57,8	59,5	61,2	62,9	64,6	66,3	68,0	69,8	71,5	73,3	75,1	76,9	78,7	80,5	82,4
30	43,9	45,5	47,1	48,7	50,4	52,0	53,7	55,4	57,1	58,8	60,5	62,2	64,0	65,7	67,5	69,3	71,0	72,9	74,7	76,5	78,3	80,2	82,1	84,0	85,9
31	46,2	47,9	49,5	51,2	52,9	54,6	56,3	58,1	59,8	61,6	63,3	65,1	66,9	68,7	70,5	72,4	74,2	76,1	78,0	79,9	81,8	83,7	85,7	87,6	89,6
32	48,7	50,4	52,1	53,8	55,6	57,3	59,1	60,9	62,7	64,5	66,3	68,2	70,0	71,9	73,8	75,7	77,6	79,5	81,5	83,5	85,4	87,5	89,5	91,5	93,6
33	51,2	53,0	54,8	56,5	58,3	60,2	62,0	63,8	65,7	67,6	69,5	71,4	73,3	75,2	77,2	79,2	81,2	83,2	85,2	87,3	89,3	91,4	93,6	95,7	97,8
34	53,9	55,7	57,6	59,4	61,3	63,1	65,0	67,0	68,9	70,8	72,8	74,8	76,8	78,8	80,8	82,9	85,0	87,1	89,2	91,4	93,5	95,7	97,9	100,2	102,4
35	56,8	58,6	60,5	62,4	64,4	66,3	68,3	70,3	72,3	74,3	76,3	78,4	80,5	82,6	84,7	86,9	89,1	91,3	93,5	95,7	98,0	100,3	102,6	105,0	107,3
36	59,8	61,7	63,7	65,7	67,7	69,7	71,7	73,8	75,9	78,0	80,1	82,3	84,5	86,7	88,9	91,2	93,5	95,8	98,1	100,5	102,9	105,3	107,7	110,2	112,7
37	62,9	65,0	67,0	69,1	71,2	73,3	75,4	77,6	79,8	82,0	84,2	86,5	88,8	91,1	93,4	95,8	98,2	100,6	103,1	105,6	108,1	110,7	113,3	115,9	118,6
38	66,3	68,4	70,6	72,7	74,9	77,1	79,4	81,6	83,9	86,2	88,6	91,0	93,4	95,8	98,3	100,8	103,4	105,9	108,6	111,2	113,9	116,6	119,4	122,2	125,0
39	70,0	72,2	74,4	76,7	78,9	81,3	83,6	86,0	88,4	90,9	93,4	95,9	98,4	101,0	103,6	106,3	109,0	111,8	114,6	117,4	120,3	123,2	126,1	129,2	132,2
40	73,8	76,2	78,5	80,9	83,3	85,7	88,2	90,8	93,3	95,9	98,5	101,2	103,9	106,7	109,5	112,4	115,3	118,2	121,2	124,3	127,4	130,5	133,7	137,0	140,3
41	78,0	80,5	83,0	85,5	88,0	90,6	93,3	95,9	98,7	101,4	104,3	107,1	110,0	113,0	116,0	119,1	122,2	125,4	128,7	132,0	135,4	138,8	142,3	145,9	149,5
42	82,6	85,2	87,8	90,5	93,2	96,0	98,8	101,7	104,6	107,6	110,6	113,7	116,9	120,1	123,4	126,7	130,1	133,6	137,2	140,8	144,5	148,3	152,2	156,1	160,2
43	87,6	90,4	93,2	96,0	99,0	101,9	105,0	108,1	111,2	114,5	117,8	121,1	124,6	128,1	131,7	135,4	139,1	143,0	147,0	151,0	155,2	159,4	163,8	168,2	172,8
44	93,1	96,1	99,1	102,2	105,4	108,6	111,9	115,3	118,7	122,3	125,9	129,6	133,4	137,4	141,4	145,5	149,7	154,1	158,5	163,1	167,9	172,7	177,7	182,9	188,2
45	99,3	102,5	105,8	109,2	112,6	116,2	119,8	123,6	127,4	131,4	135,4	139,6	143,9	148,3	152,9	157,6	162,4	167,4	172,6	178,0	183,5	189,2	195,1	201,2	207,5
46	106,3	109,8	113,4	117,2	121,0	125,0	129,1	133,3	137,6	142,1	146,7	151,5	156,5	161,6	167,0	172,5	178,2	184,2	190,4	196,8	203,5	210,5	217,8	225,4	233,3
47	114,3	118,3	122,4	126,6	130,9	135,4	140,1	145,0	150,0	155,3	160,7	166,4	172,3	178,5	185,0	191,8	198,9	206,4	214,2	222,4	231,0	240,0	249,5	259,5	270,0
48	123,9	128,4	133,1	137,9	143,0	148,3	153,9	159,7	165,8	172,2	178,9	186,0	193,5	201,4	209,8	218,7	228,2	238,2	248,9	260,3	272,3	285,1	298,7	313,0	328,2
49	135,5	140,8	146,4	152,3	158,5	165,0	172,0	179,3	187,2	195,6	204,6	214,3	224,7	235,9	248,1	261,3	275,5	290,9	307,6	325,5	344,8	365,4	387,3	410,6	435,2

PG+: Pozzetti Grandi positivi

PP+: Pozzetti Piccoli positivi

Tabella B1.2. Tabella MPN Quanty-Tray/2000 (piccoli pozzetti positivi 25-48)

PG	PP+																								
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	
0	25,3	26,4	27,4	28,4	29,5	30,5	31,5	32,6	33,6	34,7	35,7	36,8	37,8	38,9	40,0	41,0	42,1	43,1	44,2	45,3	46,3	47,4	48,5	49,5	
1	26,6	27,7	28,7	29,8	30,8	31,9	32,9	34,0	35,0	36,1	37,2	38,2	39,3	40,4	41,4	42,5	43,6	44,7	45,7	46,8	47,9	49,0	50,1	51,2	
2	27,9	29,0	30,0	31,1	32,2	33,2	34,3	35,4	36,5	37,5	38,6	39,7	40,8	41,9	43,0	44,0	45,1	46,2	47,3	48,4	49,5	50,6	51,7	52,8	
3	29,3	30,4	31,4	32,5	33,6	34,7	35,8	36,8	37,9	39,0	40,1	41,2	42,3	43,4	44,5	45,6	46,7	47,8	48,9	50,0	51,2	52,3	53,4	54,5	
4	30,7	31,8	32,8	33,9	35,0	36,1	37,2	38,3	39,4	40,5	41,6	42,8	43,9	45,0	46,1	47,2	48,3	49,5	50,6	51,7	52,9	54,0	55,1	56,3	
5	32,1	33,2	34,3	35,4	36,5	37,6	38,7	39,9	41,0	42,1	43,2	44,4	45,5	46,6	47,7	48,9	50,0	51,2	52,3	53,5	54,6	55,8	56,9	58,1	
6	33,5	34,7	35,8	36,9	38,0	39,2	40,3	41,4	42,6	43,7	44,8	46,0	47,1	48,3	49,4	50,6	51,7	52,9	54,1	55,2	56,4	57,6	58,7	59,9	
7	35,0	36,2	37,3	38,4	39,6	40,7	41,9	43,0	44,2	45,3	46,5	47,7	48,8	50,0	51,2	52,3	53,5	54,7	55,9	57,1	58,3	59,4	60,6	61,8	
8	36,6	37,7	38,9	40,0	41,2	42,3	43,5	44,7	45,9	47,0	48,2	49,4	50,6	51,8	53,0	54,1	55,3	56,5	57,7	59,0	60,2	61,4	62,6	63,8	
9	38,1	39,3	40,5	41,6	42,8	44,0	45,2	46,4	47,6	48,8	50,0	51,2	52,4	53,6	54,8	56,0	57,2	58,4	59,7	60,9	62,1	63,4	64,6	65,8	
10	39,7	40,9	42,1	43,3	44,5	45,7	46,9	48,1	49,3	50,6	51,8	53,0	54,2	55,5	56,7	57,9	59,2	60,4	61,7	62,9	64,2	65,4	66,7	67,9	
11	41,4	42,6	43,8	45,0	46,3	47,5	48,7	49,9	51,2	52,4	53,7	54,9	56,1	57,4	58,6	59,9	61,2	62,4	63,7	65,0	66,3	67,5	68,8	70,1	
12	43,1	44,3	45,6	46,8	48,1	49,3	50,6	51,8	53,1	54,3	55,6	56,8	58,1	59,4	60,7	62,0	63,2	64,5	65,8	67,1	68,4	69,7	71,0	72,4	
13	44,9	46,1	47,4	48,6	49,9	51,2	52,5	53,7	55,0	56,3	57,6	58,9	60,2	61,5	62,8	64,1	65,4	66,7	68,0	69,3	70,7	72,0	73,3	74,7	
14	46,7	48,0	49,3	50,5	51,8	53,1	54,4	55,7	57,0	58,3	59,6	60,9	62,3	63,6	64,9	66,3	67,6	68,9	70,3	71,6	73,0	74,4	75,7	77,1	
15	48,6	49,9	51,2	52,5	53,8	55,1	56,4	57,8	59,1	60,4	61,8	63,1	64,5	65,8	67,2	68,5	69,9	71,3	72,6	74,0	75,4	76,8	78,2	79,6	
16	50,5	51,8	53,2	54,5	55,8	57,2	58,5	59,9	61,2	62,6	64,0	65,3	66,7	68,1	69,5	70,9	72,3	73,7	75,1	76,5	77,9	79,3	80,8	82,2	
17	52,5	53,9	55,2	56,6	58,0	59,3	60,7	62,1	63,5	64,9	66,3	67,7	69,1	70,5	71,9	73,3	74,8	76,2	77,6	79,1	80,5	82,0	83,5	84,9	
18	54,6	56,0	57,4	58,8	60,2	61,6	63,0	64,4	65,8	67,2	68,6	70,1	71,5	73,0	74,4	75,9	77,3	78,8	80,3	81,6	83,3	84,8	86,3	87,8	
19	56,8	58,2	59,6	61,0	62,4	63,9	65,3	66,8	68,2	69,7	71,1	72,6	74,1	75,5	77,0	78,5	80,0	81,5	83,1	84,6	86,1	87,6	89,2	90,7	
20	59,0	60,4	61,9	63,3	64,8	66,3	67,7	69,2	70,7	72,2	73,7	75,2	76,7	78,2	79,8	81,3	82,8	84,4	85,9	87,5	89,1	90,7	92,2	93,8	
21	61,3	62,8	64,3	65,8	67,3	68,8	70,3	71,8	73,3	74,9	76,4	77,9	79,5	81,1	82,6	84,2	85,8	87,4	89,0	90,6	92,2	93,8	95,4	97,1	
22	63,8	65,3	66,8	68,3	69,8	71,4	72,9	74,5	76,1	77,6	79,2	80,8	82,4	84,0	85,6	87,2	88,9	90,5	92,1	93,8	95,5	97,1	98,8	100,5	
23	66,3	67,8	69,4	71,0	72,5	74,1	75,7	77,3	78,9	80,5	82,2	83,8	85,4	87,1	88,7	90,4	92,1	93,8	95,5	97,2	98,9	100,6	102,4	104,1	
24	68,9	70,5	72,1	73,7	75,3	77,0	78,6	80,3	81,9	83,6	85,2	86,9	88,6	90,3	92,0	93,8	95,5	97,2	99,0	100,7	102,5	104,3	106,1	107,9	
25	71,7	73,3	75,0	76,6	78,3	80,0	81,7	83,3	85,1	86,8	88,5	90,2	92,0	93,7	95,5	97,3	99,1	100,9	102,7	104,5	106,3	108,2	110,0	111,9	

segue

continua

PG	PP+																																														
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48																							
+	74,6	76,3	78,0	79,7	81,4	83,1	84,8	86,6	88,4	90,1	91,9	93,7	95,5	97,3	99,2	101,0	102,9	104,7	106,6	108,5	110,4	112,3	114,2	116,2																							
26	77,6	79,4	81,1	82,9	84,6	86,4	88,2	90,0	91,9	93,7	95,5	97,4	99,3	101,2	103,1	105,0	106,9	108,8	110,8	112,7	114,7	116,7	118,7	120,7																							
27	80,8	82,6	84,4	86,3	88,1	89,9	91,8	93,7	95,6	97,5	99,4	101,3	103,3	105,2	107,2	109,2	111,2	113,2	115,2	117,3	119,3	121,4	123,5	125,6																							
28	84,2	86,1	87,9	89,8	91,7	93,7	95,6	97,5	99,5	101,5	103,5	105,5	107,5	109,5	111,6	113,7	115,7	117,8	120,0	122,1	124,2	126,4	128,6	130,8																							
29	87,8	89,7	91,7	93,6	95,6	97,6	99,6	101,6	103,7	105,7	107,8	109,9	112,0	114,2	116,3	118,5	120,6	122,8	125,1	127,3	129,5	131,8	134,1	136,4																							
30	91,6	93,6	95,6	97,7	99,7	101,8	103,9	106,0	108,2	110,3	112,5	114,7	116,9	119,1	121,4	123,6	125,9	128,2	130,5	132,9	135,3	137,7	140,1	142,5																							
31	95,7	97,8	99,9	102,0	104,2	106,3	108,5	110,7	113,0	115,2	117,5	119,8	122,1	124,5	126,8	129,2	131,6	134,0	136,5	139,0	141,5	144,0	146,6	149,1																							
32	100,0	102,2	104,4	106,6	108,9	111,2	113,5	115,8	118,2	120,5	122,9	125,4	127,8	130,3	132,8	135,3	137,8	140,4	143,0	145,6	148,3	150,9	153,7	156,4																							
33	104,7	107,0	109,3	111,7	114,0	116,4	118,9	121,3	123,8	126,3	128,8	131,4	134,0	136,6	139,2	141,9	144,6	147,4	150,1	152,9	155,7	158,6	161,5	164,4																							
34	109,7	112,2	114,6	117,1	119,6	122,2	124,7	127,3	129,9	132,6	135,3	138,0	140,8	143,6	146,4	149,2	152,1	155,0	158,0	161,0	164,0	167,1	170,2	173,3																							
35	115,2	117,8	120,4	123,0	125,7	128,4	131,1	133,9	136,7	139,5	142,4	145,3	148,3	151,3	154,3	157,3	160,5	163,6	166,8	170,0	173,3	176,6	179,9	183,3																							
36	121,3	124,0	126,8	129,6	132,4	135,3	138,2	141,2	144,2	147,3	150,3	153,5	156,7	159,9	163,1	166,5	169,8	173,2	176,7	180,2	183,7	187,3	191,0	194,7																							
37	127,9	130,8	133,8	136,8	139,9	143,0	146,2	149,4	152,6	155,9	159,2	162,6	166,1	169,6	173,2	176,8	180,4	184,2	188,0	191,8	195,7	199,7	203,7	207,7																							
38	135,3	138,5	141,7	145,0	148,3	151,7	155,1	158,6	162,1	165,7	169,4	173,1	176,9	180,7	184,7	188,7	192,7	196,8	201,0	205,3	209,6	214,0	218,5	223,0																							
39	143,7	147,1	150,6	154,2	157,8	161,5	165,3	169,1	173,0	177,0	181,1	185,2	189,4	193,7	198,1	202,5	207,1	211,7	216,4	221,1	226,0	231,0	236,0	241,1																							
40	153,2	157,0	160,9	164,8	168,9	173,0	177,2	181,5	185,8	190,3	194,8	199,5	204,2	209,1	214,0	219,1	224,2	229,4	234,8	240,2	245,8	251,5	257,2	263,1																							
41	164,3	168,6	172,9	177,3	181,9	186,5	191,3	196,1	201,1	206,2	211,4	216,7	222,2	227,7	233,4	239,2	245,2	251,3	257,5	263,8	270,3	276,9	283,6	290,5																							
42	177,5	182,3	187,3	192,4	197,6	202,9	208,4	214,0	219,8	225,8	231,8	238,1	244,5	251,0	257,7	264,6	271,7	278,9	286,3	293,8	301,5	309,4	317,4	325,7																							
43	193,6	199,3	205,1	211,0	217,2	223,5	230,0	236,7	243,6	250,8	258,1	265,6	273,3	281,2	289,4	297,8	306,3	315,1	324,1	333,3	342,8	352,4	362,3	372,4																							
44	214,1	220,9	227,9	235,2	242,7	250,4	258,4	266,7	275,3	284,1	293,3	302,6	312,3	322,3	332,5	343,0	353,8	364,9	376,2	387,9	399,8	412,0	424,5	437,4																							
45	241,5	250,0	258,9	268,2	277,8	287,8	298,1	308,8	319,9	331,4	343,3	355,5	368,1	381,1	394,5	408,3	422,5	437,1	452,0	467,4	483,3	499,6	516,3	533,5																							
46	280,9	292,4	304,4	316,9	330,0	343,6	357,8	372,5	387,7	403,4	419,8	436,6	454,1	472,1	490,7	509,9	529,8	550,4	571,7	593,8	616,7	640,5	665,3	691,0																							
47	344,1	360,9	378,4	396,8	416,0	436,0	456,9	478,6	501,2	524,7	549,3	574,8	601,5	629,4	658,6	689,3	721,5	755,6	791,5	829,7	870,4	913,9	960,6	1011,2																							
48	461,1	488,4	517,2	547,5	579,4	613,1	648,8	686,7	727,0	770,1	816,4	866,4	920,8	980,4	1046,2	1119,9	1203,3	1299,7	1413,6	1553,1	1732,9	1986,3	2419,6	>2419,6																							
49																																															

PG+: Pozzetti Grandi positivi

PP+: Pozzetti Piccoli positivi

B2. Tabella MPN per la procedura analitica a 3 tubi con relativi Intervalli di Confidenza (IC)

Numero caratteristico			Indice MPN	IC95%		IC99%	
1 ^a cifra	2 ^a cifra	3 ^a cifra		inferiore	superiore	inferiore	superiore
0	0	0	<0,30	0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	1	0,30	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,10	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,71	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	1	1,5	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,93	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2,0	0,5	3,8	0,3	5,2
2	1	0	1,5	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	36	2	44
3	1	3	16	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	3	38	2	52
3	2	2	21	3	40	2	56
3	2	3	29	9	99	5	152
3	3	0	24	4	99	3	152
3	3	1	46	9	198	5	283
3	3	2	110	20	400	10	570
3	3	3	> 110				

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di dicembre 2014*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità
Roma, dicembre 2014*